

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**CAMBIOS CUANTITATIVOS EN LA CORTEZA CEREBRAL VISUAL
V2 LATERAL DE RATAS EN DESARROLLO INDUCIDOS POR
DESNUTRICIÓN PROTEÍNICA**

TESIS DOCTORAL
FLOR ALICIA PÉREZ RAMÍREZ
2012

*Al Profesor **Edmundo Vallecale**, Fundador del Departamento de Ciencias Fisiológicas y Cátedra de Fisiología en la Escuela de Medicina José María Vargas, Universidad Central de Venezuela, en 1962. Pionero de los estudios de Investigación en Desnutrición y Sistema Nervioso en Venezuela.*

A mi bella familia por su paciente espera y apoyo incondicional...

AGRADECIMIENTOS

A Miguel Requena, Ex-Decano de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela, por haberme motivado y apoyado para realizar el presente trabajo.

A mis directores de Tesis, Profesores Luis Santamaría, por su paciencia, tolerancia y permanente orientación. Francisco Clasca, con gran aprecio, por su constante apoyo, asesoría y orientación.

A la Profesora Isabel de Andrés, por haber concedido el permiso de mi estancia en el Departamento de Anatomía, Histología, Embriología y Neurociencia.

A la Sra. y amiga Carmen Palomo, por su tesón y amor al servicio de los Doctorandos en el Departamento y a mí en particular.

A David Muñoz Valverde, José Manuel Badajoz Martínez, Santiago García Puebla y Miguel Ángel Andrés Martín, Técnicos en animales de Experimentación, por su tesón en el cuidado de los animales y la puesta en marcha de la base experimental, después de muchos intentos sin resultados.

.....y en especial a Carmen Fernández Criado Directora del Gabinete Veterinario de la Universidad Autónoma de Madrid.

A las integrantes del Laboratorio Central del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia.

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo, Venezuela, por el apoyo económico parcial otorgado para la realización de este trabajo.

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	ESTUDIOS SOBRE LOS EFECTOS ESTRUCTURALES Y COGNITIVOS DE LA MALNUTRICION PROTEINICA EN EL DESARROLLO CEREBRAL.....	6
A.	ESTUDIOS SOBRE LA PÉRDIDA DE PESO EN EL CEREBRO Y OTROS ÓRGANOS EN DESNUTRICIÓN E INANICIÓN. SENSIBILIZACIÓN CON RESPECTO AL IMPACTO SOCIAL: DESCRIPCIÓN DEL KWASHIORKOR. ...	6
B.	ESTUDIOS DE LA CAPACIDAD INTELECTUAL HUMANA DISMINUIDA POR EFECTO DE LA DESNUTRICIÓN EN LOS NIÑOS.....	7
C.	ESTUDIOS EXPERIMENTALES DEL DESARROLLO CEREBRAL. RELACIÓN DE LOS TRASTORNOS CON LA CARENCIA DE NUTRIENTES ESPECÍFICOS.....	8
D.	EFFECTOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CEREBRO.....	9
E.	MODELOS EXPERIMENTALES DE DESNUTRICIÓN PROTEÍNIC Y REALIMENTACIÓN.....	10
1.	Deficiencia Proteínica y el Cerebro.....	10
2.	Estudios sobre efectos específicos en la estructura cerebral, la cognición y el comportamiento.....	11
3.	Estudios estructurales. Introducción de las técnicas estereológicas en el estudio de las modificaciones estructurales del cerebro.....	12
4.	Daño permanente frente a reversible. Estudios de realimentación y seguimiento generacional.....	14
III.	BASES TEORICAS Y FUNDAMENTACIÓN	18
A.	LAS PROTEINAS Y LOS AMINOACIDOS: DIGESTIÓN, METABOLISMO Y CONSIDERACIONES GENERALES.....	18
1.	Aspectos Fisiológicos.....	18
2.	Aminoácidos Esenciales.....	19
3.	Aspectos Energético-Nutricionales.....	19
4.	La fracción lábil de aminoácidos libres.....	24
B.	LA DESNUTRICIÓN COMO PROBLEMA	26
C.	ASPECTOS GENERALES DE LA DESNUTRICION.....	28
D.	ALGUNAS ALTERACIONES FUNCIONALES ASOCIADAS CON LA DESNUTRICION	31
1.	Fisiología del ayuno.....	31
2.	Otras consideraciones funcionales.....	36
E.	LA ISOCORTEZA CEREBRAL.....	38
1.	Organización general y citoarquitectura.....	38
2.	Histología de la corteza visual V2L de rata adulta.....	39
3.	Corteza Visual V2L. Consideraciones funcionales.....	40
F.	DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL.....	46
1.	Consideraciones generales.....	46
2.	El desarrollo postnatal de la corteza visual.....	49
G.	ASTROGLÍA, DESARROLLO Y CORTEZA VISUAL.....	51
H.	OLIGODENDROGLÍA Y MIELINIZACIÓN.....	54
I.	DAÑO CEREBRAL POR DESNUTRICION PROTEINICA Y EFECTOS DE LA REALIMENTACION EN MODELOS ANIMALES	56

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	59
A. HIPÓTESIS DE TRABAJO	59
B. OBJETIVOS.....	59
V. MATERIAL Y METODOS	61
A. LA CORTEZA VISUAL DE RATA COMO MODELO EXPERIMENTAL	61
B. MATERIAL.....	62
1. Animales de experimentación.....	62
2. Alimentación.	63
3. Área cerebral escogida.....	65
4. Coordenadas utilizadas.	65
C. METODOS.....	67
1. Protocolo de extracción de muestras.....	67
2. Procesamiento de las muestras.	67
3. Métodos de tinción	68
a. Inmunohistoquímica. Método de avidina-biotina peroxidasa	68
b. Inmunotinción para NeuN	70
c. Inmunotinción para la proteína gliofibrilar (GFAP)	70
4. Sistemática de la inmunohistoquímica.....	71
D. MÉTODOS CUANTITATIVOS.....	73
1. Breves consideraciones teóricas acerca de la cuantificación estereológica de la densidad numérica y del número absoluto de partículas.....	73
2. Cálculo del factor de retracción (FR).....	74
3. Cálculo de la proporción peso cerebral / peso corporal	76
4. Volumen del área visual V2L	76
5. Estimación del número y densidad de neuronas.	77
6. Estimación del número y densidad de astrocitos.	78
7. Cálculo del volumen neuronal promedio.	78
E. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	80
F. FOTOGRAFÍA	83
VI. RESULTADOS	84
A. RESULTADOS CUALITATIVOS.	84
1. Morfología de las ratas según su estado nutricional y grupo de edad.....	84
2. Identificación del Area Visual V2L.....	84
3. Descripción histológica	85
4. Inmunohistoquímica para NeuN.....	86
5. Inmunohistoquímica para GFAP	88
B. RESULTADOS CUANTITATIVOS.....	91
1. Relación entre peso corporal y el peso cerebral, según la condición nutricional, la edad y el sexo.....	91
2. Estimación de volumen cerebral y volumen del área V2L según la condición nutricional, la edad y el sexo.	94
3. Densidad numérica y número absoluto de neuronas según la condición nutricional, la edad y el sexo.	100
4. Diferencias de la densidad numérica y el conteo absoluto de astrocitos según la condición nutricional, la edad y el sexo.....	106
5. Diferencias del volumen promedio neuronal según la condición nutricional, la edad y el sexo.....	112
6. Diferencia de la ratio de pesos cerebrales y corporales, densidad numérica y número absoluto de neuronas y astrocitos y volumen promedio neuronal en ratas realimentadas desde P0 o P21.....	115

7. Resultados del análisis discriminante aplicado al estudio de la clasificación de los animales en los grupos nutricionales definidos.....	120
VII. DISCUSIÓN.....	123
A. IMPORTANCIA DE LA FORMULACIÓN DIETÉTICA.....	123
B. HALLAZGOS CUALITATIVOS Y MORFOLÓGICOS.....	124
C. HALLAZGOS CUANTITATIVOS.....	125
1. Relación peso cerebral / peso corporal (RP) y volumen cerebral.....	125
2. Efecto del momento de inicio de la realimentación.....	128
3. Consideraciones Funcionales.....	130
4. Consideraciones metodológicas.....	132
VIII. CONCLUSIONES.....	134
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	135
X. INDICE DE ABREVIATURAS.....	148

I. INTRODUCCION

En numerosas poblaciones socio-económicamente marginadas de diversos países, sobre todo del llamado Tercer Mundo, los niños reciben una alimentación insuficiente en nutrientes. Debido a la elevada demanda metabólica del intenso crecimiento y desarrollo característicos de la infancia, y a la propia labilidad de dichos procesos, las carencias alimentarias resultan particularmente dañinas durante este periodo.

Los términos de malnutrición y desnutrición infantil son usualmente confundidos y hasta utilizados en la literatura como sinónimos. Sin embargo, hemos de aclarar que tomaremos la definición de desnutrición como aquella afección que ocurre cuando el cuerpo o el organismo no recibe los nutrientes suficientes y conduce a un estado patológico provocado por la falta de ingesta o de absorción de alimentos, o por estado de exceso de demanda metabólica; mientras que el término de malnutrición estaría dado por la consecuencia de no cumplir con una dieta equilibrada en calidad y cantidad, lo cual bien podría corresponder a un estado de desnutrición en un sentido, o de sobrenutrición en el otro.

El presente trabajo se define como un modelo de desnutrición infantil selectiva en el cual se induce un esquema de malnutrición en el que se reduce selectivamente el aporte proteínico, en una dieta estandarizada.

Una de las más graves e insidiosas consecuencias de la desnutrición infantil es que el desarrollo neuropsicológico de estos niños puede sufrir una merma irreversible. Se ha demostrado que la desnutrición severa durante los primeros años de infancia produce un deterioro grave, incluso histológicamente detectable en el desarrollo del cerebro (Gratham Mc. Gregor, 1995; Stanfield, 1982). En realidad esto no es de extrañar, ya que hoy sabemos que es precisamente a lo largo de esos años cuando tienen lugar en los centros superiores del cerebro, a escala masiva, varios de los procesos de diferenciación celular (desarrollo dendrítico, sinaptogénesis y refinamiento sináptico, mielinización, etc.) que son imprescindibles para la formación de unos

circuitos neuronales funcionalmente óptimos y, como resultado, unas funciones cognitivas, emocionales y sociales normales. Las alteraciones de estos procesos, como consecuencia de un déficit de nutrientes sostenido y severo durante el periodo postnatal del desarrollo, tienen así la potencialidad de generar, irreversiblemente, grados diversos de deterioro cognitivo social y emocional. Además, si la nutrición deficiente afecta a una población de modo habitual, los trastornos del neurodesarrollo pueden tornarse endémicos y contribuir a que el subdesarrollo se perpetúe (Van Gelden, 1994).

Además del evidente interés de prevenir y corregir la malnutrición infantil con estrategias basadas en evidencia científica, el estudio de los efectos de la desnutrición durante varias etapas de la vida provee en sí mismo una importante información y entendimiento acerca del papel de las influencias ambientales sobre el desarrollo del cerebro (Weindruch, 1996)

El desarrollo del Sistema Nervioso es un proceso dinámico de diferenciación celular e histogénesis en el que la multiplicación y expresión génica de cada célula es finamente regulada a lo largo del tiempo de desarrollo por una multitud de señales intercelulares y humorales procedentes del propio tejido en desarrollo y del entorno humoral y sensorial (Véase Sur y Rubenstein, 2005, para una revisión). A diferencia de otros tejidos, el desarrollo cerebral implica la generación de una inmensa diversidad de tipos celulares, cada uno en número y localización precisa, los cuales se conectan luego sinápticamente entre sí de modo exquisitamente selectivo (Fame y cols., 2011). Este complejo proceso se prolonga mucho más allá de la gestación, hasta el final de la infancia. Durante todo ese periodo la disponibilidad de nutrientes ejerce un papel permisivo, y por tanto, potencialmente limitante. Por ello, los déficits alimentarios severos y sostenidos pueden interferir los mecanismos de desarrollo antes citados y ocasionar una deficiencia neurológica (Alvarez y cols., 1994; Levitt, 2003).

Durante la lactancia en la primera infancia (0-4 años, en humanos), se completa la diferenciación neuronal y tienen lugar la interconexión sináptica de las células cerebrales y la mielinización de

sus axones. Por ello, las demandas nutricionales del cerebro son máximas en estos periodos; es lo que se conoce como períodos críticos (Levitt, 2003) en los que el desarrollo cerebral es particularmente sensible a las carencias nutricionales (Bedi, 1987; Dobbing, 1981).

En la rata, modelo animal habitual para estudios experimentales de malnutrición infantil, el desarrollo del cerebro es relativamente inmune a los efectos de la malnutrición materna durante la gestación (Dobbing, 1974, 1981, 1987). Incluso en gestaciones múltiples como las habituales en ratas, el pequeño tamaño relativo de los fetos permite al parecer que la madre pueda cubrir las demandas metabólicas de los fetos, consumiendo sus propias reservas corporales.

Las crías recién nacidas presentan igualmente un rápido crecimiento. Sin embargo en este periodo el correcto aporte de nutrientes pasa a depender de la capacidad conductual para la lactancia activa de la cría y de la producción y calidad de la leche materna. Si la madre recibe una inadecuada cantidad de nutrientes durante el período de la lactancia, el volumen de la leche disminuye, pero no su valor nutritivo (Mueller y Cox, 1945).

Desde los primeros estudios rigurosos de condiciones de desnutrición postnatal experimental en ratas (Bass y cols., 1970; Morgane y cols., 1978; Resnick y cols., 1979), se observó que en las ratas neonatales desnutridas se retarda más el crecimiento del cuerpo que el cerebral. En cambio, otros estudios (Rocha-de-Melo y Guedes, 1997) observaron que cuando la desnutrición ocurría en un periodo postnatal avanzado, hacia el final de la lactancia y destete, las modificaciones se incrementaban, resultando en una disminución significativa del crecimiento y mortalidad elevada entre los 18 y los 25 días después del nacimiento (West y Kemper, 1976). Además, la malnutrición postnatal en estas etapas llega a afectar al desarrollo cerebral. Así, a pesar de que los animales desnutridos tienen un mayor peso cerebral en relación al peso corporal (por el retraso del crecimiento antes mencionado), la corteza cerebral disminuye de volumen absoluto (Cragg, 1972; West y Kemper, 1976; Angulo-Colmenares y cols., 1979; Cordero y cols., 1986, 2003; Bedi, 2003). Se

han descrito disminución del número de células piramidales, de la densidad de las espinas dendríticas y de la glía (Cordero,2003; Giuffrida y cols.,1980; Paz y cols., 1991; Jones y cols., 1996; Feoli y cols.,2008) . Estudios conductuales en estos animales parecen indicar una disminución en la capacidad cognitiva (Cowley y Griesel,1959; Zamenhof y Van y Marthens,1978; Levitsky y Strupp, 1995), más errores en el aprendizaje, y anormalidades en la emoción y en la reactividad (Villescas y cols.,1979; Bedi, 2003). Por otra parte, desde el punto de vista neurohistológico, se ha reportado que se producen alteraciones en el crecimiento y orientación de las dendritas apicales de las neuronas piramidales de la corteza cerebral, y que estos cambios no se revierten con la realimentación, aunque se comience tempranamente a los diez días después del nacimiento (Cordero y cols., 1986).

Y mas aún, Cowley (1959, 1963) señala que el deficiente desarrollo causado por la desnutrición prenatal en ratas de una primera generación (F1) puede ser transmitido a la siguiente generación (F2), aún en ausencia de la malnutrición de F2, y promueve el concepto de *continuidad* en la condición de malnutrición crónica, que puede extenderse incluso hasta la F6. Aunque en relación con este concepto, Zamenhof (1978, 1981) señala que en su experiencia no apreció tal efecto acumulativo o de continuidad entre las generaciones de F2 a F6 con respecto a F1, y que a pesar de una mayor mortalidad apreciada en estos modelos experimentales de desnutrición a través de distintas generaciones, se manifiesta un efecto de fuerte selección natural en función de mecanismos de adaptación tales como disminución en los requerimientos del metabolismo basal y ahorro en el requerimiento de alimentos con utilización mas eficaz a expensas de mejoría en la absorción intestinal y menor destrucción de aminoácidos esenciales.

Sin embargo, tales indicaciones en cuanto al efecto de la desnutrición en el cerebro en desarrollo, y de su posible corrección, prevención o reversibilidad con la realimentación, han adolecido hasta el momento de demostración sistemática. Dentro de este campo de investigación, se hace necesario el reforzar los aportes que los estudios

morfofuncionales puedan hacer con miras no sólo de demostrar los cambios que de por sí el proceso de desnutrición genere, sino que también aquéllos que permitan establecer tanto las estructuras más críticamente afectadas como sus posibilidades de recuperación con procesos de realimentación en las diferentes etapas posteriores al estado de desnutrición.

En síntesis, podemos plantear que la desnutrición proteínica induce problemas específicos que aún no se han investigado en detalle en diversas áreas cerebrales, o que presentan aspectos que merecen nuevos análisis. Algunas de las preguntas que se han planteado debido a las controversias que aún se mantienen sobre muchos aspectos, son: ¿Los efectos de la desnutrición proteínica severa durante un período limitado a la infancia perduran hasta la edad adulta, o son reversibles? ¿Hasta qué punto tiene efectos de recuperación, en tales casos, la re-alimentación en etapas posteriores?

En el texto que sigue revisaremos primero las diversas líneas de evidencia científica que confluyen en el estudio experimental de desnutrición proteínica pre- y postnatal en roedores y de sus efectos sobre el desarrollo cerebral. Repasaremos por último los aspectos más relevantes de la arquitectura histológica y desarrollo de las áreas visuales de la corteza cerebral de la rata, que serán la región sobre la que centraremos el análisis cuantitativo de la presente Tesis.

II. ESTUDIOS SOBRE LOS EFECTOS ESTRUCTURALES Y COGNITIVOS DE LA MALNUTRICION PROTEINICA EN EL DESARROLLO CEREBRAL.

A continuación, haremos un recuento de los estudios y observaciones que, a título de antecedentes históricos, recopilaron diversos autores en lo relacionado con los efectos estructurales y cognitivos de la malnutrición proteínica en el desarrollo cerebral (Widdowson,1972; Resnick y cols.,1979; Stanfield,1982; Winick,1983; Levitsky y cols.,1995; Bengoa, 2011).

A. ESTUDIOS SOBRE LA PÉRDIDA DE PESO EN EL CEREBRO Y OTROS ÓRGANOS EN DESNUTRICIÓN E INANICIÓN. SENSIBILIZACIÓN CON RESPECTO AL IMPACTO SOCIAL: DESCRIPCIÓN DEL KWASHIORKOR.

A mediados del siglo XIX, en el Reino Unido y también en otros países, comenzó a enfatizarse la importancia de la *buena nutrición de los niños*, desarrollándose la educación en este sentido. Se observó que los niños mentalmente más activos eran aquéllos que tenían el mejor estado físico y nutricional.

Chossat (1843) y Jackson (1915), observaron en animales de experimentación que cada órgano pierde peso con una particular velocidad durante la inanición.

Carry Mann (1926), en su estudio clásico de “*Los efectos de la dieta suplementaria de los alumnos de la Escuela Dr. Bernard Home*”, observó que a los muchachos que le habían dado “extras de leche” se convertían en “los más fogosos e incontenibles...”

Una similar observación fue realizada por Leighton y Clark (1929) en Escocia.

Williams Cicely (1935), británica que trabajaba en aquel entonces en Costa de Oro (hoy Ghana), publicó en The Lancet, sus observaciones sobre un nuevo cuadro clínico grave al que, de acuerdo al nombre que le daban las madres africanas, denominó Kwashiorkor.

Trowell (1937) describe en Uganda, la “pelagra infantil”, que coincide con el cuadro observado por Williams; en Venezuela, Oropeza (1937) lo titula “síndrome de carencia: avitaminosis”, aun cuando el

énfasis lo ponen en el déficit de proteínas; en Chile, Scroggie (1941), describe el “síndrome pluricarencial de la infancia”, y con el mismo nombre se conoce en varios otros países de América Latina; en Jamaica, Platt (1974) lo llama “sugar baby”. Sin embargo, aun en 1954, el mismo Trowell comentaba que “no se conoce que estas anormalidades en la conducta se deban a trastornos en el cerebro....”!

Clark (1951), en Kenya, se refirió a que los cambios mentales fueron la mayoría constantes y probablemente una de las características más importante de la enfermedad.

Helweg-Larsen (1952) señala que se describieron episodios parecidos en los campos de concentración alemanes, en los cuales hubo una gran carestía de alimentos, que probablemente ocasionó el deterioro mental, de la memoria y del pensamiento y apatía, y fue considerado como un problema global.

B. ESTUDIOS DE LA CAPACIDAD INTELECTUAL HUMANA DISMINUIDA POR EFECTO DE LA DESNUTRICIÓN EN LOS NIÑOS.

Mackenzie (1944) en su estudio de 712 niños escolares, concluyó que había una correlación entre nutrición y logro escolar.

Kugelmass y cols. (1944) y Tredgold (1956) destacaron que los trastornos psicológicos son reversibles cuando la alimentación se ajusta a la corta edad, y en cualquier caso nunca más tarde de los 4 años de edad.

Stock y Smithe (1963) demostraron en dos grupos de niños homogéneos desde un punto de vista genético, que los sujetos desnutridos manifestaron una amplia diferencia no solamente en lo concerniente a su peso, talla y circunferencia craneal, sino también en cuanto a su desempeño intelectual.

Babson (1965) estudió 16 pares de gemelos cuyos pesos difirieron significativamente al nacer. En estos casos la desnutrición ya se había establecido durante su vida fetal más bien que en la extrauterina. La realimentación subsiguiente se manifestó ineficaz para prevenir el deterioro del desarrollo intelectual y somático.

Gruenwald (1965) no halló alguna influencia significativa sobre el crecimiento cerebral humano tras malnutrición fetal. Sin embargo, puntualiza que el estrés fetal prolongado posiblemente induce alteraciones histológicas en la sustancia blanca de ambos hemisferios.

Durante la mitad de los años sesenta un grupo de investigadores, Scrimshaw y Gordon (1968), volcaron su atención hacia la triste realidad de que la mitad de los niños del mundo estaban sufriendo diversos grados de malnutrición y que tal condición podría limitar su capacidad intelectual como ante los retos de un mundo en avance tecnológico.

Villescas R., Zamenhof S. y Guthrie (1979) proponen abrir una línea de investigación que estudie los efectos de los factores medioambientales, antes de que se manifiesten los efectos de la desnutrición temprana en el desarrollo conductual.

C. ESTUDIOS EXPERIMENTALES DEL DESARROLLO CEREBRAL. RELACIÓN DE LOS TRASTORNOS CON LA CARENCIA DE NUTRIENTES ESPECÍFICOS.

Frank (1911) aisló una sustancia en el arroz polaco, más tarde identificada como vitamina B1, cuya carencia causaba polineuritis.

Sugita (1917) todo un pionero y visionario, enfatizó que el crecimiento de la corteza cerebral de la rata es precoz respecto al del resto del cuerpo. La corteza alcanza el grosor del adulto y desarrolla las seis capas durante las primeras tres semanas de vida postnatal, pero el máximo crecimiento del cuerpo ocurre entre la tercera y la séptima semana. Sugiere que el mejor período para estudiar la corteza cerebral de la rata es el de la lactancia, durante las tres primeras semanas, cuando el crecimiento de la corteza y la diferenciación neuronal son máximos. Y en 1918 ya había señalado que tanto el peso cerebral como el volumen cortical continúan incrementando, incluso a través de la vida post natal, aunque no tan rápidamente como en las etapas mas tempranas. El crecimiento tardío se debe principalmente al desarrollo de las células de sostén, de los tejidos intercelulares

(neuroglia y vasos sanguíneos), a la incursión axonal dentro de la corteza y a su mielinización; todo lo cual va efectuando una separación mayor entre los cuerpos neuronales, con el consecuente aumento del volumen cortical.

Schmitz (1932) observó el efecto de la lecitina en gatos y conejos, sobre el peso y la composición de sus cerebros.

Moscow y Litkens (1940) observaron que el 70% de pacientes alcanzaban mas alta capacidad de trabajo y esfuerzo mental sí comían conserva de ternero, en comparación con otras personas desnutridas que se alimentaban a base de carbohidratos...!

Ehrenberg (1953) publicó que el rendimiento de los test psicológicos mejoraba tras la ingesta diaria de 1.5g. de fosfato de amonio, lo que indujo a pensar que el fósforo era bueno para el cerebro.

Enesco y Leblond (1962) midieron en la rata el crecimiento de los órganos. Demostraron un tipo general de crecimiento: Hiperplasia, período en el cual el crecimiento depende del aumento del número de células; Hiperplasia e hipertrofia, período de aumento de número y tamaño; e Hipertrofia, aumento del tamaño de las células únicamente. Estos fueron conceptos aplicados posteriormente en los estudios de desarrollo cerebral, como comentaremos mas adelante.

D. EFECTOS EN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL CEREBRO.

Desde hace tiempo, se describen cambios patológicos en el cerebro causados por el déficit de diversos componentes vitamínicos. Mellanby (1926) se interesó en el problema de la ataxia producida por deficiencia de vitamina A (*"su falta ocasiona degeneración, la consecuente incoordinación de los movimientos y también sordera"*).

Durante el estudio de la deficiencia de vitamina B1 Peters y cols. (1929-38) descubrieron los ácidos pirúvico y láctico en los cerebros de cerdos.

Elsom y cols. (1930); Williams y cols. (1939) describen cambios mentales en humanos deprivados de vitamina B1.

Maurer y Tsai (1931) estudiando las deficiencias del complejo B y de las vitaminas D y C en ratas, concluyeron que la carencia de tales elementos causaba el empobrecimiento en la composición química del cerebro.

Bennetts y Chapman (1937) demostraron en corderos que la denominada “Ataxia Enzoótica”, caracterizada por descoordinación y parálisis, era debida a la deficiencia de cobre.

Prickett y cols. (1939) demostraron que el déficit de vitamina B1 causaba polineuritis

En prisioneros de guerra japoneses, Burgués (1946), Hobbs y Forbes (1946), Moore (1946) describieron disturbios psicológicos, lesiones neurológicas y alteraciones en la visión asociados a deficiencias del complejo B y de la vitamina A.

Millen y cols. (1954) señalan que la vitamina A es importante en el desarrollo del sistema nervioso fetal. Tanto su exceso como su defecto en la dieta materna durante la gestación causa malformaciones cerebrales e hidrocefalia.

La ataxia provocada por deficiencia de manganeso ratas preñadas, fue prevenida por el suministro de complementos de este elemento, Hurley y Everson (1963).

Dickerson y cols. (1967) demostraron en cerebros de diversos cerdos recién nacidos desnutridos que “el desarrollo químico cerebral se preserva con los nutrientes de la madre, aunque sus cuerpos se mantengan pequeños”.

E. MODELOS EXPERIMENTALES DE DESNUTRICIÓN PROTEÍICA Y REALIMENTACIÓN.

1. Deficiencia Proteínica y el Cerebro.

Stewart y Platts (1968) describieron un EEG de deficiencia congénita de proteína y demostraron la semejanza de un EEG de un niño con Kwashiorkor. Stewart estudió la estructura histológica del SNC, y encontró cambios o anormalidades morfológicas en los

cerebros y médulas espinales de cerdos y perros malnutridos incluyendo reducción en el tamaño y número celular en la corteza.

La preocupación se volcó hacia la posibilidad de que la malnutrición impuesta durante la vida temprana no solamente reduciría el tamaño del cerebro sino que se quedaría permanentemente de pequeño tamaño. El fenómeno fue observado en ratas (Chase y cols., 1967; Culley y Lineberger, 1968; Dobbing, 1965; Smart y cols., 1973; Winick y Nobel, 1966; Zamenhof y cols., 1971), en ratones (Randa y Derby, 1973), cobaya (Chase y cols., 1971) y cerdos (Dikerson y Dobbing, 1966).

2. Estudios sobre efectos específicos en la estructura cerebral, la cognición y el comportamiento.

A Donaldson (1911) (citado por Dobbing) le fue muy difícil detectar alguna alteración de los depósitos de lípidos, pero sus experimentos fueron realizados entre P30 y P51 cuando el proceso de mielinización había casi completado en las ratas jóvenes.

Eayrs y Lishman (1955) demostraron en ratas recién nacidas sometidas a baja ingesta de comida y seguidas hasta los 20 días, una marcada disminución de sus capacidades comparadas con el grupo control.

Dobbing (1964) demuestra, al final del período de lactancia (P21), una disminución del contenido de colesterol de los cerebros de ratas desnutridas.

Cowley y Griesel (1963) evidenciaron que las ratas sometidas a dieta hipoproteica y/o nacidas de madres desnutridas, presentaron un pobre desempeño en la prueba de laberinto.

Stoch y Smythe (1963) realizaron estudios sobre desnutrición severa sufrida en niños entre los 10 y 16 meses de edad. Cinco y once años más tarde, esos niños presentaron EEG anormales, más pequeña circunferencia cefálica y comportamiento mental deteriorado, en comparación a niños en mejores condiciones de hogar y sin trastornos de malnutrición.

Dobbing (1964), Winick y Noble (1966) dirigieron los trabajos pioneros que usaron DNA como un indicador de crecimiento cerebral, y señalaron que los cerebros de mamíferos eran mas vulnerables a la desnutrición durante el periodo en el cual el cerebro estaba creciendo más rápidamente.

Numerosos autores, Leuba y Rabinowicz (1979), Morgane y cols. (1978), Thomas y cols.(1979), West y Kemper (1976), Bedi y Bhide (1988), han determinado que la corteza cerebral, la región cerebral más estrechamente unida a la función cognitiva e intelectual, exhibe una reducción en volumen, después de la desnutrición neonatal.

Cragg (1972), Clark y cols. (1973), Dobbing y cols. (1971), Noback y Eisenman (1981), Saissi y Saissi (1973), West y Kemper (1976) señalan que también la corteza cerebral también exhibe una reducción de su amplitud con la desnutrición.

Sin embargo, Leuba y Rabinowicz (1979) señalan que el número de neuronas corticales, no se afecta con la desnutrición. Aunque esta conservación del número de neuronas corticales puede ser interpretado como una evidencia de un caso remarcable de plasticidad neural de cara a la desnutrición severa (Sugita, 1918; Callison y Spencer, 1968; Cragg, 1972; Saissi y Saissi, 1973; Cordero y cols., 1976; Leuba y Rabinowicz, 1979; Bedi y cols., 1980; Thomas y cols., 1979, 1980; Bedi y Warren, 1983).

3. Estudios estructurales. Introducción de las técnicas estereológicas en el estudio de las modificaciones estructurales del cerebro.

Sereni (1966), Adlard y Dobbing (1971), Gambetti y cols. (1972), Robertson y cols. (1985) demostraron que en animales desnutridos disminuyen las proyecciones tálamo-corticales acetilcolinesterasa positivas (ACHE +) a la corteza visual V1.

Han sido numerosos los autores, Salas y cols. (1974), West y Kemper (1976), Angulo-Colmenares y cols. (1979), Leuba y Rabinowicz (1979), Noback y Eisenman (1981), Schonheit (1982), Cordero y cols. (1986), Yoshida (1985), Schoenheit y Haensel (1988), Sarkar y cols.

(1990), que, ante la preocupación de que la malnutrición causaba daño estructural permanente al cerebro, realizaron estudios que, mediante técnicas de tinción de Golgi demostraron que la desnutrición causa una significativa alteración en las células piramidales de la corteza cerebral, reducción en la densidad cortical de las espinas dendríticas, y en la complejidad de la arborización dendrítica de la corteza. Además de observar que la desnutrición temprana, reduce significativamente el número total de células gliales corticales.

Cragg (1972), Gambetti y cols. (1974), Warren y Bedi (1984) demuestran que la densidad de las sinapsis corticales no parece ser afectada por la malnutrición, pero el número total de sinapsis en la corteza visual se ve claramente reducida.

Según Angulo-Colmenares (1979) las crías de ratas sometidas a una dieta hipoproteínica del 8% de caseína durante el embarazo, mostraron, en P20, comparadas con el grupo control, alteraciones en aspectos estructurales como las dimensiones de los hemisferios cerebrales, así como el grosor del S1 de la corteza cerebral, el volumen de tejido cerebral ocupado por el neuropilo en las capas II y IV, el volumen de los cuerpos celulares en esas capas, el volumen estimado y el grosor de sus dendritas basales.

Bedi (1984,1989, 1994,2003), Peeling y Smart (1994) utilizan las técnicas estereológicas, que han hecho posible obtener estimaciones del total del número de neuronas, para determinar los efectos de períodos de desnutrición durante la vida temprana sobre varias regiones cerebrales de la rata, incluida la corteza visual.

Frota-Mendonça y cols. (2004) observaron que los astrocitos parecen desarrollar mecanismos de plasticidad compensatoria durante su proceso de diferenciación, especialmente cuando la malnutrición es instalada desde la lactancia. Comparadas con las ratas controles jóvenes, ambos grupos con desnutrición de 30 y 60 días demostraron una reducción del número de astrocitos en el SNC.

Los resultados de Bedi (1994), Feoli y cols. (2008) sugieren que la malnutrición temprana conduce a la alteración de la gliogénesis o

proliferación de las células gliales en la corteza cerebral, en el núcleo supraquiasmático y el área preóptica del hipotálamo.

4. Daño permanente frente a reversible. Estudios de realimentación y seguimiento generacional.

Cowley y Griesel (1959) intentaron demostrar que el síndrome de Kwashiorkor como modelo de desnutrición hipoproteínica tiene efectos sobre generaciones sucesivas de ratas blancas. El retardo de crecimiento, determinado en las curvas de peso, se refleja tanto en la generación parental (F0) como en la primera generación filial (F1). La mortalidad fue alta en las crías de generación filial F1.

Cowley y Griesel (1963) describen los efectos de una dieta hipo proteínica sobre el crecimiento y desarrollo de una segunda generación de ratas (F2): retardo en la emergencia de la actividad motora y en las respuestas a la estimulación auditiva.

Zamenhof y Van Marthens (1978) establecen un modelo de “eficiencia” de la incorporación o utilización de los alimentos” comparando grupos de ratas control / desnutridas durante 9 generaciones. Los animales desnutridos movilizan sus reservas de nutrientes con objeto de evitar la desaminación de aminoácidos esenciales y mejoran su absorción intestinal de nutrientes, siendo así más eficientes que los controles y pudiendo incluso inducir más tarde a mayor producción de tejido fetal lo cual sugiere la mejoría en la inducción enzimática. Incluso, algunas madres desnutridas pueden producir crías que escapen a los efectos de la desnutrición.

Los estudios de la rehabilitación del cerebro después del período de la malnutrición, Gopinath y cols. (1976), Hamberger y Sourander (1978), revelaron que el período de actividad mitótica de la corteza de la rata se prolonga después de la malnutrición temprana, permitiendo que el período de máxima síntesis proteínica cerebral continúe.

Dyson y Jones (1976) señalan que aunque el tamaño relativo del cerebro (relación cerebro/cuerpo) de las ratas normalmente nutridas disminuya entre los 13 y 17.5 días postnatales, esta reducción ocurre

mucho mas tarde en las ratas desnutridas previamente, lo cual puede revertirse eventualmente mediante realimentación.

Diversos autores, Bass (1970), Saissi y Saissi (1973), Angulo-Colmenares (1979), Leuba y Rabinowicz (1979), Thomas y cols. (1979, 1980), Bedi y cols. (1980), Warren y Bedi (1982, 1988, 1989), Gundappa y Desiraju (1988), Díaz-Cintra y cols. (1990), señalan que la rehabilitación nutricional tras la malnutrición temprana, consigue la recuperación de la anchura cortical y de otros parámetros como los cambios en la densidad celular glial cortical y la relación sinapsis/neurona cortical.

Winick (1983) plantea que si los animales fueron desnutridos durante la vida temprana la atrofia es permanente, y sí la malnutrición se presenta después del destete la atrofia puede revertirse.

Myrtle (1968), Warren y cols. (1985), Desai (1996), Soto- Moyano (1999) indican que el retorno a la dieta óptima después de P21 (destete) no corrigió déficit corporales que sí se corrigen si se comienza en P0, a pesar de haberse provocado una dieta hipo proteínica a la madre durante la etapa prenatal.

Warren y Bedi (1982, 1983, 1989), Gundappa y Desiraju (1988), Díaz -Cintra, y cols. (1990) ponen de manifiesto que en el sistema visual, la desnutrición produce inicialmente una profunda reducción en el número y tamaño de las fibras ópticas que emanan desde el ojo y terminan en las estructuras cerebrales superiores, una disminución del número de sinapsis en la corteza visual; y cambios en las estructuras de las células piramidales que enervan a la corteza visual. La mayoría de estos cambios fue revertida tras la rehabilitación nutricional.

Warren y Bedi (1984) observan que el efecto de la desnutrición sobre la relación sinapsis-neurona, puede revertirse si se mantiene el período de rehabilitación por un tiempo prolongado.

El efecto deletéreo de la desnutrición sobre el crecimiento y orientación de las dendritas apicales de las células piramidales atípicas persistió en la adultez y no pudo ser revertida por rehabilitación nutricional a pesar de haberse comenzado tan temprano como P10, Cordero (1986, 2003), Schônheit y Haensel (1988), Ragsdale y Grove

(2001). Ha de tomarse en cuenta el efecto diferente que produce la desnutrición, así como la rehabilitación, en las distintas estructuras cerebrales, según su más reciente aparición desde el punto de vista filogenético.

Bedi (1994) observa que el número de células cerebrales (neuronas y glía) puede estar genéticamente controlado con niveles fijos difíciles de alterar, incluso por influencias medioambientales tan severas como períodos prolongados de desnutrición durante la vida temprana; y en caso de que se alteren podrían recuperarse cuando se comienza la realimentación lo más tempranamente posible.

En resumen, el estado actual de los conocimientos basados en los estudios animales, principalmente en roedores, indica que la desnutrición proteínica en el periodo pre y postnatal produce cambios en el grosor, volumen y número de neuronas de la corteza cerebral. Además en el, quizás limitado aún, número de estudios que han examinado específicamente el efecto de la realimentación tras el período de carencia proteínica (Myrtle y Guthrie, 1968; Bass y cols., 1970; Saissi y Saissi, 1973; Angulo-Colmenares y cols., 1979; Leuba y Rabinowicz, 1979; Thomas y cols., 1979, 1980; Bedi y cols., 1980; Warren y Bedi, 1982, 1988, 1989; Gundappa y Desiraju, 1988; Díaz-Cintra y cols., 1990; Desai y cols., 1996), se han valorado cuantitativamente los efectos sobre la histología de la corteza cerebral, pudiéndose concluir que mientras más temprano se inicie la realimentación, se obtiene más recuperación de los parámetros estudiados (Cordero, 1986, 2003; Schônheit y Haensel, 1988; Ragsdale y Grove, 2001).

En las últimas décadas, la incorporación de las técnicas estereológicas (Bedi, 1984, 1989, 1994, 2003; Peeling y cols., 1994), aunadas a la mayor sofisticación de los métodos de estudio de la composición neuroquímica, y los estudios de genética y biología molecular, así como la aplicación de modernas técnicas de imagen no invasivas, parecen ofrecer mejor alternativa que la que tuvieron los estudios iniciales hechos con técnicas de cuantificación relativamente antiguas y más expuestas a sesgo.

Actualmente el interés se dirige hacia la realización de estudios sobre áreas corticales asociativas (no-primarias), que por su lento desarrollo postnatal pudieran ser más sensibles a los efectos de la carencia nutricional, y de lo cual no hemos obtenido referencia.

En este sentido, los campos de la biología y psicología del desarrollo se enfrentan con la comprensión de las relaciones normales en la estructura con los cambios de funciones complejas que ocurren en la infancia y la niñez, hasta la pubertad.

Tal y como señala Gilbert (2010), la privación nutricional durante el desarrollo fetal conduce a la reducción permanente de la neuroquímica y el tamaño cerebral y, como consecuencia, a la perturbación del aprendizaje y el deterioro de la plasticidad sináptica.

Al retomar la polémica sobre la eficacia de los distintos modelos de reproducción de la desnutrición (hipocalórica severa frente a hipoproteínica), la trayectoria de desarrollo de los sistemas específicos complican la mayoría de los tipos de análisis. A lo sumo, nos quedamos con correlaciones generales con las cuales los detalles de los aspectos funcionales son mejor interpretados que los cambios neuroanatómicos detallados (Levitt, 2003).

III. BASES TEORICAS Y FUNDAMENTACIÓN

A. LAS PROTEINAS Y LOS AMINOACIDOS: DIGESTIÓN, METABOLISMO Y CONSIDERACIONES GENERALES.

Los aminoácidos son los componentes estructurales de las proteínas, los denominados “sillares de las proteínas”, y estas a su vez, constituyen las sustancias fundamentales en la estructuración de los tejidos del organismo en general y de los tejidos especializados en particular, como lo es el tejido cerebral (Lehninger, 2009).

1. Aspectos Fisiológicos.

Desde el punto de vista fisiológico, consideramos importante destacar que la digestión de las proteínas comienza en el estómago donde, gracias al pH ácido, las enzimas activas denominadas pepsinas hidrolizan las uniones peptídicas, dando origen a proteínas menos complejas que continúan su digestión a nivel intestinal, gracias a la acción de las enzimas del ribete en cepillo y las proteasas pancreáticas activadas en tripsina, que a su vez activa a otras enzimas de tipo carboxipeptidasas. Éstas son capaces de hidrolizar las uniones peptídicas de los extremos de las moléculas proteicas, liberando oligopéptidos y aminoácidos libres que pueden ser absorbidos por el enterocito. En el recién nacido la alta permeabilidad del epitelio intestinal permite incluso absorber proteínas completas, como las IgA de la leche materna, de gran importancia en la inmunidad adquirida, así como otras proteínas provenientes de alimentación artificial, de importancia en afecciones de tipo hiper sensibilidad tardía. En el adulto, la mayoría de los aminoácidos son absorbidos en el intestino superior y medio, a través de mecanismos específicos de transporte, en su mayor parte mediados por canales de sodio. Es de interés hacer notar que los mismos transportadores se encuentran a nivel de la barrera hematoencefálica del ser humano adulto, como comentaremos más adelante. La absorción de aminoácidos dependiente del sodio compite con la absorción de hidratos de carbono (Bissiacchi, 2010).

2. Aminoácidos Esenciales.

Se llaman aminoácidos esenciales aquellos que el organismo no puede sintetizar y que, por consiguiente, deben ser provistos por la dieta: leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina e histidina. El exceso del resto de los aminoácidos es utilizado como fuente de energía y no como base para la síntesis de proteínas. El suministro y adecuada ingesta de estos aminoácidos es crucial, ya que tanto sus carencias como sus excesos pueden conducir a procesos patológicos o disfuncionales, como por ejemplo la *fenilcetonuria*, que es una enfermedad congénita debida a la ausencia de una enzima llamada fenilalanina hidroxilasa, cuya ausencia deriva el metabolismo de la fenilalanina hacia la formación de fenilpiruvato potente neurotóxico que afecta al desarrollo y maduración cerebral, dando lugar a la oligofrenia fenilpirúvica; la *histidinemia*, la cual se debe a la ausencia de la enzima histidasa que degrada a la histidina, y que puede cursar con retraso mental y defecto en el habla; el déficit de metionina puede conducir a alteraciones diversas debido a su participación en reacciones muy importantes para la síntesis del ADN; y la ataxia cerebelosa y la enfermedad de Hartnup pueden aparecer con alteraciones del metabolismo del triptófano, y su posible relación con trastornos del desarrollo cerebral han empezado a despertar interés (Gómez-Jarabo, 2009).

Nuestro modelo experimental se basa en un estado de carencia dietaria global proteínica, en la cual se han suministrado todos estos aminoácidos esenciales, contenidos en la lactoalbúmina suministrada.

3. Aspectos Energético-Nutricionales.

Las proteínas, a diferencia de los lípidos y de los hidratos de carbono, no constituyen una reserva energética, porque forman parte integral de los tejidos como proteínas estructurales, como transportadores de la pared celular, o como enzimas. Los requerimientos diarios de una persona adulta normal son alrededor de 0,5 a 0,7 gramos/kg de peso, con los cuales se reponen las proteínas que se pierden por la descamación de los epitelios (20 a 30 g/día). En

la dieta promedio de un ser humano adulto, es necesario ingerir 30 a 50 g de proteínas diarias, y estas necesidades aumentan en casos fisiológicos especiales, como son el embarazo y la lactancia, y el crecimiento durante la infancia y la adolescencia; así como durante diferentes situaciones patológicas, quirúrgicas y de estrés. De hecho, los requerimientos diarios de proteínas en el lactante son de hasta 2 gramos/kg de peso (Patiño, 1981).

El valor nutritivo o valor biológico de una proteína depende de su constitución de aminoácidos, y sobre todo de su contenido de aminoácidos esenciales que deben ser provistos en la dieta para la construcción o síntesis de la masa celular y de las estructuras de soporte del organismo. De allí el concepto de índice de eficiencia proteínica de los alimentos, cuya tabla la encabezan los huevos con un índice de 3,92 seguidos por el pescado (3,55), y la leche (3,09); para finalizar con el pan blanco, con 0,90. Las proteínas de origen animal tienen un mayor valor biológico, aunque la soja (2,32) muestra un mayor o casi igual índice que la carne bovina cocida (2,3) (FAO, 1970).

El porcentaje de energía aportada por cada grupo de los alimentos, varía en relación con el nivel socioeconómico y cultural. En los Estados Unidos de Norteamérica, el 15% de las calorías provienen de proteínas, el 40% de lípidos y el 45% de carbohidratos. En otras partes del mundo, la cantidad de calorías que provienen de carbohidratos suele ser mucho mayor que la suministrada por la suma de proteínas y grasas. En Mongolia, por ejemplo, grasas y proteínas juntas han constituido menos del 20% de las calorías totales de la ingesta (De Onis y cols., 1993). En los trópicos y sub trópicos, el maíz (*Zeamays*), que es la fuente más importante de alimento, contiene pocas proteínas (9%), de las cuales la mitad es *ceína*, que carece de los aminoácidos esenciales lisina y triptófano. Por ello, se ha tratado de desarrollar una cepa mutante con el “maíz opaco”, que produce mucho más lisina, para sustituir al normal en las regiones donde más se necesita. También se han desarrollado otros granos ricos en proteínas como el *triticale* (un cruzamiento de trigo y centeno). Algunos frijoles contienen poca metionina, los guisantes o “chícharos” son pobres en

triptófano y metionina, y el maní o cacahuete carece tanto de metionina como de lisina, en comparación con las carnes. De allí la necesidad de combinar adecuadamente los alimentos de un vegetariano estricto, que no coma carne, pescado, leche ni huevos, para obtener los aminoácidos esenciales, aunque estas sean concepciones poco precisas hasta hoy, sobre todo tomando en cuenta que algunos aminoácidos esenciales pueden ser suplidos por otros, como en el caso de las necesidades de fenilalanina que pueden ser cubiertas en un 70 a 75% por tirosina, y de metionina, que puede cubrirse en un 80 a 90% con cisteína (Bowman y Rand,1984).

En todo caso, la producción de proteína animal es extremadamente cara en términos de necesidades de energía, y no se justificaría aumentarla considerando el suministro cada vez menor de fuentes de la misma. Además, en la alimentación de animales que producen carne, cada unidad de proteína vegetal con que se alimentan sólo da el 10 al 30% de su peso como proteína animal comestible. El proceso es muy ineficaz, y se lograría más con la ingestión directa por el hombre de proteínas vegetales, a condición de poder lograr el equilibrio correcto de aminoácidos (Bowman y Rand ,1984).

A continuación ofrecemos, en resumen, las necesidades comparativas diarias (mg/kg peso) de aminoácidos esenciales entre el lactante y el adulto, en orden decreciente (modificado de Bowman y Rand, 1984):

	Lactante	Adulto
➤ Leucina	150	37
➤ Isoleucina	126	23
➤ Valina	105	27
➤ Lisina	103	27
➤ Fenilalanina	90	37*
➤ Treonina	87	18
➤ Metionina	45	37**
➤ Histidina	34	0
➤ Triptófano	22	8,5

* 70 a 75% de las necesidades de fenilalanina pueden cubrirse con tirosina.

** 80 a 90% de las necesidades de metionina pueden cubrirse con cisteína.

En el adulto, los carbohidratos presentan la propiedad, desde el punto de vista metabólico energético, de conservar proteínas, lo cual reviste utilidad en el manejo de estados de ayuno frente a situaciones de catabolismo proteico acelerado, al reducir la pérdida de nitrógeno urinario. En contraste, las grasas endógenas que se movilizan en el ayuno como fuente de energía, o las grasas exógenas de la alimentación, no son capaces de conservar proteína y, por consiguiente, no evitan la erosión de la masa celular corporal. Por otra parte, si se administra abundante proteína exclusivamente, sin otra fuente calórica, se perderá sin utilizarse mucho el nitrógeno administrado, salvo en situaciones de suministro directo, en forma parenteral, de soluciones de aminoácidos. Es por ello que se recomienda una relación dietética de calorías/nitrógeno, o sea calorías de origen no proteico/nitrógeno de 100 a 200 (Patiño, 1981). En este contexto, es de destacar el hecho de que, al menos en el adulto, una significativa proporción de aminoácidos del cerebro se derivan de la glucosa, y ello representa una importante proporción de la glucosa consumida por el cerebro; mientras que en otros órganos el uso de carbohidratos para la síntesis de aminoácidos no esenciales solo ocupa una pequeña proporción de las necesidades de glucosa del tejido. En el cerebro fetal y en el del recién nacido de rata, el rápido flujo de glucosa hacia aminoácidos característico del cerebro adulto, aun no está presente, y se va presentando a partir del día 10 al 15 del post nacimiento, coincidiendo con el momento de maduración de la corteza cerebral, convirtiéndose en un factor crítico de nutrición a partir de este momento. En el feto y en el desarrollo post natal, las necesidades proteínicas son mucho mas orientadas hacia la estructuración de órganos y sistemas, y los aportes calóricos glucídicos no podrán proteger contra las deficiencias que pueden inducir los estados carenciales alimentarios (Miller, 1969).

Es importante destacar el papel del ácido glutámico y de sus derivados, la glutamina y el GABA, en esta encrucijada metabólica o rutas de conversión entre carbohidratos y aminoácidos, ya que él dobla su concentración en el sistema nervioso central desde el nacimiento

hasta el destete, de manera que a los 20 a 21 días ya ha adquirido los niveles del adulto. En la Figura 1, se resumen estas rutas energéticas de conversión:

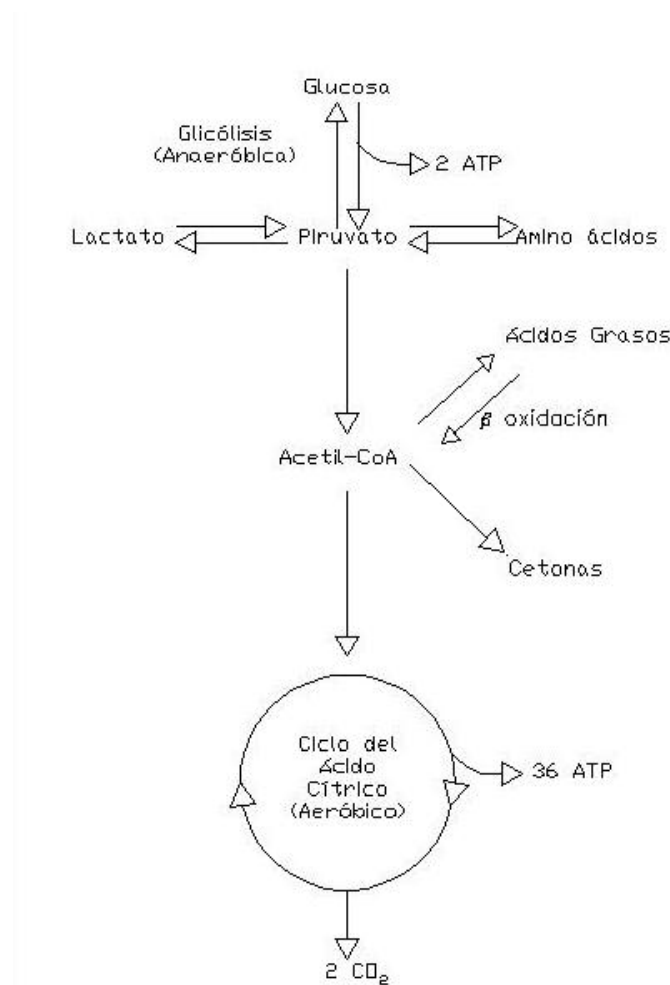


FIGURA 1. Encrucijada metabólica entre carbohidratos-aminoácidos y ácidos grasos. (Tomado y modificado de Wolfe, 1981)

Durante el desarrollo normal, tanto en humanos como en roedores, existe una suerte de conmutador para el uso de combustible a escoger de una combinación de glucosa, lactato y cuerpos cetónicos (beta hidroxibutirato y acetoacetato) en el cerebro inmaduro, hasta una total preferencia por la glucosa en el cerebro adulto, siendo que entonces solo bajo condiciones de ayuno prolongado, diabetes e hipoglicemia pasarían estos sustratos a ser utilizados. De hecho, el alto contenido de ácidos grasos de la leche genera cuerpos cetónicos circulantes en concentraciones suficientes como para contribuir a las necesidades sintéticas y energéticas de la maduración cerebral

temprana. Con el comienzo de la lactancia, y la ingesta de leche con alto contenido graso, las crías de rata se tornan hipercetonémicas, y permanecen así durante todo este período. Mientras la utilización de glucosa es relativamente baja en el cerebro de la rata recién nacida, las tasas de incorporación y utilización de beta hidroxibutirato alcanzan su pico hacia la segunda y tercera semana post natal, para luego declinar hasta alcanzar los niveles del adulto.

Así como en el intestino, la entrega y transporte tanto de glucosa como de ácidos monocarboxílicos desde la sangre hacia el cerebro, requiere de proteínas transportadoras específicas: las proteínas transportadoras de glucosa facilitativas (GLUTs), y las proteínas transportadoras del ácido monocarboxílico protón-acopladas (MCTs). Estos transportadores han sido subclasificados en varios sub tipos, siendo la GLUT3 y la MCT2 las predominantes a nivel neuronal. La comprensión de la regulación normal en la expresión de estos transportadores, seguramente contribuirá a conseguir potenciales utilidades terapéuticas futuras (Vannucci, 2003).

4. La fracción lábil de aminoácidos libres.

Otro aspecto importante a destacar es el de la fracción lábil de aminoácidos libres. En fase de estado estable, la cantidad de proteínas totales del cuerpo en un sujeto sano es constante. La síntesis de proteínas mediante incorporación de aminoácidos endógenos o exógenos es igual a la degradación y a las pérdidas externas. Las proteínas representan cerca del 15 al 20% del peso corporal total (cerca de 13 kg en un adulto normal, bien nutrido), de las cuales cerca de la mitad permanecen como proteínas estructurales relativamente inertes (hueso, tendón, cartílago) y la otra mitad constituye la estructura de otros órganos como músculo esquelético, vísceras y proteínas plasmáticas, las cuales están constantemente sujetas a un rápido recambio. Luego de su digestión y absorción, ya a nivel plasmático y tisular, los aminoácidos exógenos se unen a los aminoácidos endógenos provenientes de la degradación proteínica en los tejidos de recambio constante para formar una fracción lábil de aminoácidos. El

equilibrio entre diversos compartimentos de fracciones lábiles de aminoácidos es tan suficientemente rápido vía transporte de aminoácidos en el lecho sanguíneo, que pueden ser considerados como uno solo, y apenas constituye un 1% del total de los aminoácidos corporales. Sin embargo, proporciona un mecanismo para el movimiento de aminoácidos entre diversos órganos, y el consumo de estos aminoácidos determina en gran parte el estado del balance nitrogenado en el organismo, en un constante equilibrio entre la vía anabólica o catabólica que seguirán estos aminoácidos (Figura 2) (Stein y Buzby, 1981).



FIGURA 2. Esquema del equilibrio entre compartimentos lábiles de aminoácidos vía del transporte en el lecho sanguíneo. (Modificado de Stein y Buzby, 1981).

Tal dinámica del recambio proteínico tiene, sin embargo, desventajas. Resulta costoso en términos de energía, ya que la reutilización de aminoácidos no es completamente eficiente. A más rápido recambio, más pérdida de aminoácidos que deben ser reemplazados por la dieta. De manera que si el suministro ya de energía o de aminoácidos no es suficiente, la adaptación de un patrón metabólico a otro puede comprometerse, y es así como se presenta la encrucijada de decisión para el organismo entre dos respuestas metabólicas de importancia entre las que elegir, como por ejemplo entre síntesis de proteínas circulantes o reparación de una herida (Stein y Buzby, 1981).

La fracción lábil de aminoácidos libres del cerebro de rata se ha dividido en tres grupos: a) aquellos que incrementan significativamente en concentración desde el nacimiento hasta la vida adulta, tales como el ácido glutámico, el ácido gamma amino butírico (GABA), la glutamina

y el ácido aspártico; b) aquellos que exhiben un patrón variable de concentración, pero que tienden a disminuir generalmente desde el nacimiento hasta el destete, tales como la prolina, valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina y metionina; c) el resto de los aminoácidos, los cuales no muestran una tendencia significativa desde el nacimiento hasta la edad adulta. Los cambios en los niveles de aminoácidos libres en el cerebro se han atribuido a la reducción de la permeabilidad a los aminoácidos a medida que el animal madura, y al cese del suministro materno al nacimiento (Miller, 1969).

B. LA DESNUTRICIÓN COMO PROBLEMA

La desnutrición en los seres humanos constituye un problema histórico, biológico, moral, social, político y económico que aún no ha podido ser erradicado, siendo de mayor gravedad en algunas regiones del mundo, como Africa Sub Sahariana y Mongolia, así como en los estratos socioeconómicos más bajos del resto de los países en desarrollo. Se entiende por desnutrición la condición en la cual se hallan aquellas personas cuyo consumo energético en su dieta diaria se encuentra continuamente por debajo del mínimo de los requerimientos para mantener una vida saludable y llevar a cabo una actividad física ligera, con una aceptable relación peso-talla corporal (FAOSTAT, 2009).

Para el año 2004 se reportaron en el mundo 153 millones de niños con peso insuficiente e índices de altura por debajo de los parámetros normales. Peor aún, de ellos, 11 millones de niños murieron de causas relacionadas con el hambre. La mayoría de estas muertes se atribuye no al hambre absoluta, sino a las enfermedades asociadas al déficit nutricional (UNFAO, 2004).

Se ha reportado una importante relación entre el estado nutricional y la conducta reproductiva. En los países desarrollados, la relación entre edad y embarazo depende principalmente de factores de tipo sociocultural, y la dieta no parece ser un factor limitante para las

modificaciones físicas características de la pubertad y de la menarquia. En cambio, en todos los estratos sociales de los países en vías de desarrollo, la tendencia es la de tener hijos lo más tempranamente posible. En esos países, la desnutrición retarda la pubertad de 2 a 3 años (Riley, 1994).

Por otra parte, cada año, más de 20 millones de bebés nacen con bajo peso en países en vías de desarrollo. Estos bebés pueden morir en la infancia, y los que sobreviven sufren a menudo discapacidades físicas y cognitivas de por vida (UNFAO, 2004).

En los seres humanos, está claramente establecida una relación entre los factores que afectan el crecimiento y el desarrollo fetal, con la talla postnatal. De hecho, el crecimiento postnatal, además de la carga genética, depende del ambiente y, muy especialmente, del nivel socioeconómico. Algunos autores (Delemarre, 1993) consideran que las consecuencias de esos factores sobre el crecimiento postnatal se pueden recuperar, siempre y cuando no hayan afectado etapas críticas del proceso de crecimiento y desarrollo fetal. Se ha destacado la importancia no sólo de la alimentación desde el nacimiento, sino también del estado físico y nutricional de la madre, antes y durante el embarazo y la lactancia.

Contrariamente a cuanto se cree comúnmente, se demuestra que el aumento de peso durante el embarazo no es un indicador válido del estado nutricional del recién nacido, pero sí lo es el bajo peso al nacer.

Una tercera parte de los niños sometidos a condiciones de gestación no óptimas, mantiene una talla pequeña a lo largo de su vida. Los niños que provienen de familias con mejor nivel económico, son más altos (Delemarre, 1993). Por otra parte, los efectos negativos de la desnutrición sobre el crecimiento son agravados por una mayor incidencia y gravedad de las enfermedades asociadas a un aporte nutricional insuficiente o desbalanceado, y a condiciones sanitarias inadecuadas (Bradley, 1993).

Sin embargo, hasta el presente, todas estas demostraciones funcionales acerca del efecto de la desnutrición en el desarrollo del sistema nervioso, han adolecido de la suficiente comprobación

morfológica que sirva de base para consolidar los diferentes hallazgos, de manera tal que puedan sugerirse pautas y conductas adecuadas tanto en la desnutrición, como en la realimentación.

Es por esta razón que nos vemos motivados a contribuir con nuestro trabajo a llenar ese importante vacío, sobretudo por la adecuación metodológica que intentamos hacer sobre un área específica de la corteza cerebral visual, como es la V2L.

Consideramos un aporte importante afinar tanto los aspectos de adecuación de las dietas suministradas, como las fases de la inducción de la desnutrición y de la de realimentación, junto con el estudio de la estructura de la corteza cerebral que nos permita obtener resultados confiables desde el punto de vista morfológico comparativo.

C. ASPECTOS GENERALES DE LA DESNUTRICION.

La desnutrición global se define como un aporte insuficiente de los requerimientos calóricos mínimos necesarios para mantener el balance metabólico del organismo. La desnutrición parcial se define como una insuficiencia relativa de algunos de los componentes básicos de la dieta, no sintetizables por el organismo. Entre éstos se incluyen las proteínas, los minerales y las vitaminas. Por ejemplo, se puede diferenciar la desnutrición calórica de la desnutrición proteínica. Esta es la más frecuente y se refiere a un aporte proteínico insuficiente, el cual es reemplazado a veces por la ingesta de carbohidratos. Se habla, en estos casos de desnutrición por carencia de energía proteínica (PEM), que se refiere a la disminución de la cantidad y a la baja calidad de los nutrientes proteínicos disponibles para el organismo (Connolly y Kvalsvig, 1991; Schurch, 1995).

La desnutrición proteínico-calórica (PCM), se refiere, en cambio, a diferentes formas clínicas de desnutrición, entre las cuáles se cuentan el marasmo y el Kwashiorkor. El marasmo o malnutrición calórico proteínica es la carencia crónica de proteínas y calorías, y se caracteriza por bajo peso y depleción muscular y de grasa subcutánea

con algún mantenimiento de proteína visceral, hasta llegar a la *caquexia*; mientras que el Kwashiorkor es la deficiencia aguda primaria de proteínas (malnutrición proteínica), y se caracteriza por edema, depleción muscular con conservación de grasa subcutánea, peso “normal” o hasta aumentado, hipoalbuminemia, reducción del recuento de linfocitos, depresión de inmunidad celular (anergia) y transferrina baja (Connolly y Kvalsvig, 1993; Patiño, 1981). En ambos casos, aparecen también deficiencias en la ingesta de micronutrientes, como son: iodo, hierro, cobre, calcio, tiamina, riboflavina, ácido ascórbico, retinol, etc. (Schurch, 1995).

Las deficiencias alimentarias se han clasificado en dos tipos:

- a. Deficiencias tipo I: en las cuáles el crecimiento corporal inicialmente se mantiene, pero la concentración de los nutrientes, de sus metabolitos y de micronutrientes es reducida (Schurch, 1995).
- b. Deficiencias tipo II: en las cuales se observa una disminución del crecimiento corporal general, aun siendo la concentración de los nutrientes normal, sobretudo la de nitrógeno, aminoácidos esenciales, zinc, potasio, sodio, fósforo (Schürch, 1995).

En los últimos años, ha cobrado mayor fuerza la investigación sobre la desnutrición leve o moderada y la influencia de los micronutrientes (vitamina B6, hierro y zinc, contenidos en los productos de origen animal) sobre el desarrollo neuroconductual al nacer y en la infancia (Kirsey y cols., 1990,1993; Gorman, 1995; Pollit,1995; Wachs,1995). En la desnutrición leve, tanto el aporte calórico, como la captación de nutrientes específicos, están por debajo de las necesidades diarias, en un nivel que no llega a producir alteraciones en los índices antropométricos, ni síntomas clínicos específicos (Wachs, 1995).

En niños alimentados con leche artificial, es frecuente la deficiencia de ácidos grasos de cadena larga (sobre todo de ácido

linoleico), esenciales para la síntesis de los componentes de las membranas biológicas. Sin entrar a considerar la importancia afectivo-psicológica del contacto madre-recién nacido, el cuál parece tener implicaciones de tipo fisiológico, se ha propuesto que las alteraciones observadas se deben a las deficiencias en hormonas y factores de crecimiento, como son el factor de crecimiento tipo insulina (IGF) I y II, citoquinas, factor de crecimiento epitelial (EGF), tiroxina, cortisol, prolactina, presentes en abundancia en la leche materna (Uauy y De Andrace, 1995).

En líneas generales, es necesario diferenciar el efecto de los estados carenciales o de desnutrición tanto en función del grupo de edad en el que se presenten, como en cuanto a la agudeza o cronicidad con el que se instalen; además de tomar en cuenta la coexistencia de situaciones patológicas, traumáticas o de estrés que acompañen a la situación del desnutrido. Así, es diferente la situación que presentaría una persona que haga un ayuno prolongado en estado de reposo y sin patologías iniciales asociadas, de una que presente una situación traumática o post quirúrgica, o que presente una condición patológica como las enfermedades cancerosas, todo lo cual ameritaría la elaboración del perfil metabólico-nutricional de cada persona (Patiño, 1981).

Aunado a lo anterior, han de tomarse en cuenta las diferencias metabólicas y adaptativas que las diferentes especies animales han desarrollado tanto ontogénica como filogénicamente, durante el transcurso evolutivo, a la hora de poder establecer extrapolaciones con la especie humana en los ensayos experimentales. En este sentido Dyson (1976) se refiere a la extrapolación de datos obtenidos de investigaciones nutricionales en animales de laboratorio con el humano, en las cuales, por ejemplo, se establece que los cambios en el peso del cerebro humano entre los 15 y los 20 meses después del nacimiento, se corresponden en similar proporción de desarrollo con los de la rata entre P13 y P17.5; y que los cambios en el de 6 meses de vida fetal a 1 mes post natal para el humano, equivalen a los de P75 y P110 para el

mono, y en contraste con la rata, el crecimiento del cerebro en el cobaya es primariamente prenatal.

Por otra parte, las diferencias en cuanto a capacidad digestiva de proteínas de difícil digestión, principalmente provenientes de fuentes vegetales, que existen entre las diferentes especies de animales, pueden establecer cambios en cuanto al valor y capacidad regeneradora de la leche materna durante el período de lactancia, aunque ya ha sido mencionada la estabilidad que mantiene la leche en su composición a pesar del régimen de desnutrición a que haya sido sometida la madre, aunque si disminuye su volumen significativamente (Mueller y Cox, 1945).

Es por ello que en el presente trabajo hemos intentado escoger un modelo de desnutrición que toma en cuenta fundamentalmente el valor nutricional de las proteínas en términos generales cuantitativos o porcentuales, con respecto a su aporte dietético, en lo que podría entenderse como modelo de desnutrición proteínica durante fases muy específicas del desarrollo pre y postnatal, en un modelo animal que, de acuerdo a lo expuesto por autores previos como Miller (1969), guarda una aceptable similitud con estos aspectos en el humano.

D. ALGUNAS ALTERACIONES FUNCIONALES ASOCIADAS CON LA DESNUTRICION

1. Fisiología del ayuno.

Desde el punto de vista fisiológico y metabólico, las condiciones de desnutrición, malnutrición, inanición por ayuno y sobrenutrición-obesidad, son situaciones relacionadas que, sin embargo, guardan un carácter particular como entidades específicas.

En las situaciones de ayuno prolongado, que conduzcan a la inanición, y a través de sus distintas etapas, el comportamiento del organismo con respecto a la utilización de sus fuentes energéticas y plásticas varía según la situación ante la cual éste ha de adaptarse. De hecho, la existencia de grasa como forma de reserva de energía, está

fundamentalmente relacionada con la necesidad de supervivencia que las distintas especies de animales tienen, sobre todo aquellas que ofrecen gran movilidad en sus hábitos de vida, entre ellas los mamíferos, después de los insectos y de las aves. Las grasas de reserva proporcionan más del 75% de las calorías utilizadas luego de los primeros días de privación de alimento, tal y como ya acotó Benedict en 1915 (citado por Cahill, 1970).

En el organismo, el combustible energético puede ser acumulado en tres formas: como carbohidratos, como proteínas o como grasas. Los carbohidratos en los sistemas animales son almacenados como glucógeno, y por cada gramo de esta macromolécula almacenada dentro de las células, debe acumularse 1 a 2 gramos de agua para mantener la isotonía del medio intracelular, lo cual lo hace relativamente ineficiente. La proteína no es acumulada en el hombre solamente como un reservorio de nitrógeno, ya que cualquier proteína extra ingerida es metabolizada, el nitrógeno expulsado como urea, y las calorías si están en exceso, serán dirigidas como reserva hacia el tejido adiposo ya que, como el glucógeno, las proteínas para estar en el ambiente intracelular precisan un medio acuoso. Solo los lípidos son almacenados dentro de las células en un ambiente no acuoso, de manera que 1 gramo de tejido adiposo se aproxima bastante al estimado de 9,4 calorías por gramo de triglicérido puro. Así, en el hombre primitivo, que ciertamente dependía de su movilidad, el proceso metabólico de reserva que seleccionó y que aún está presente, es el de la expansión del tejido adiposo durante la situación de plenitud, y su depleción durante la privación. De manera que el glucógeno del músculo y del hígado tenderá a ser usado en condiciones de emergencia, o bajo circunstancias de anoxia o ejercicio vigoroso. A diferencia de los roedores, el hombre preserva parcialmente su glucógeno hepático durante el ayuno por acelerar la gluconeogénesis durante la transición del estado de alimentación al de ayuno (Cahill, 1970).

Normalmente, el principal combustible del organismo es la glucosa, y su más crítico usuario es el cerebro, al que le es tan esencial

como el oxígeno. Durante el período temprano del ayuno, el cuerpo de un hombre promedio sintetiza cerca de 160 gramos de glucosa por día. La mayor parte de ella la produce en el hígado, pero también la corteza renal sintetiza una apreciable cantidad de glucosa, sobre todo en situación de ayuno prolongado. Otros tejidos glucolíticos, como los eritrocitos, los leucocitos, la médula ósea, la médula renal y los nervios periféricos, y también los músculos (aunque en menor grado), metabolizan glucosa pero convirtiéndola primariamente en lactato y piruvato (Figura 3). La pérdida de proteína involucrada y las pérdidas sustanciales de minerales corporales (como calcio, potasio y magnesio), causan una pérdida de agua asociada, que es la causa principal de la disminución de peso inicial. En esta etapa, la sangre muestra un incremento de aminoácidos liberados de las células musculares, principalmente la alanina sintetizada a partir del ácido pirúvico, como fuente principal de la producción de glucosa por el hígado. El ciclo de la alanina ofrece, además, un medio eficiente de transporte hacia el hígado del nitrógeno derivado de los aminoácidos liberados por la lisis proteínica.

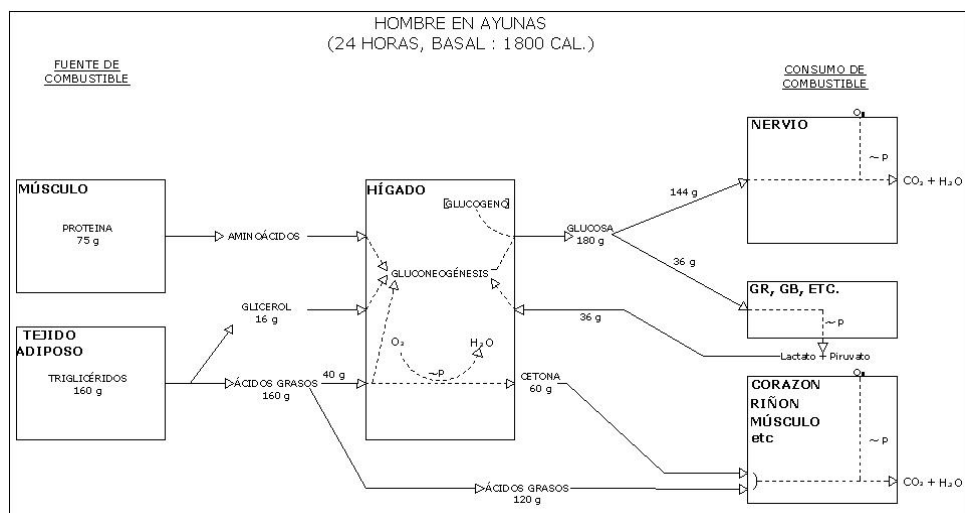


FIGURA 3. Ruta metabólica de las fuentes de combustible durante el ayuno de 24 horas en el humano. (Tomado y modificado de Cahill, 1970)

Si esta situación continuase, para obtener los requerimientos diarios de glucosa, el organismo tendría que consumir cerca de 155 gramos de proteína muscular, lo cual implicaría la pérdida de 25 gramos de nitrógeno diario; y como la cantidad total de nitrógeno de un adulto es de aproximadamente 1000 gramos, y que la pérdida de un 50% de éste resultaría letal, es lógico que el organismo tome medidas de control para evitarlo, por lo que a partir de las primeras semanas de ayuno el músculo esquelético reduce su liberación de alanina, y la síntesis hepática y renal de glucosa declina, para comenzar a hacer uso de los tejidos grasos como una fuente alterna de energía, así como de los cuerpos cetónicos derivados, los cuales proporcionan energía mediante procesos de oxidación, y el cerebro muestra una adaptación para usarlos como sustratos alternos a la glucosa (Figura 4), como ya lo hemos comentado (Young y Scrimshaw, 1971). En este sentido, mas recientemente se ha planteado, incluso, el posible uso terapéutico protector de los cetoácidos en situaciones con compromiso cardíaco o enfermedades neurológicas degenerativas tipo Alzheimer y Parkinson (Cahill y Veech, 2003).

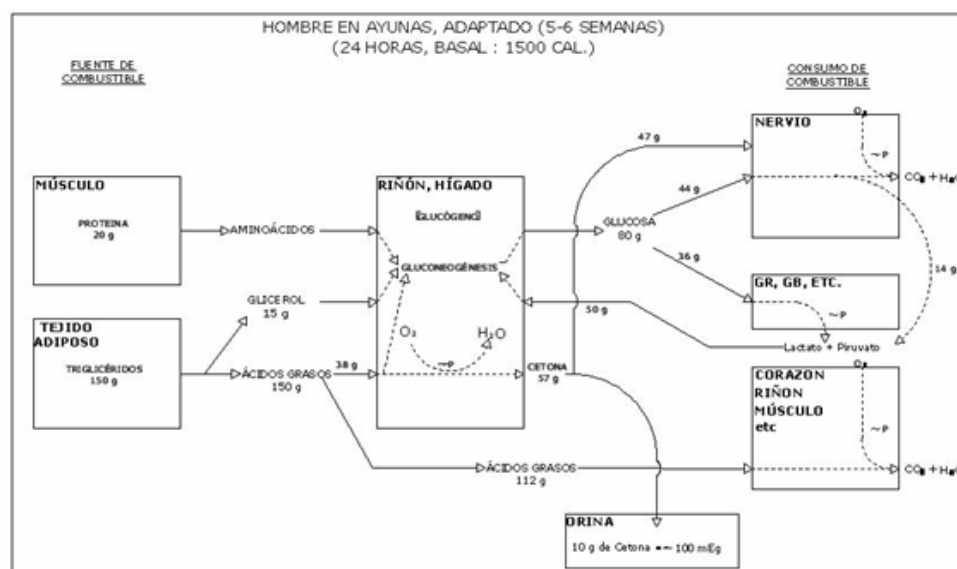


FIGURA 4. Ruta metabólica de las fuentes de combustible durante el ayuno de 5 a 6 semanas en el humano. (Tomado y modificado de Cahill, 1970).

En síntesis, durante el ayuno prolongado el hombre tiene dos fuentes principales de combustible, la proteína muscular y los triglicéridos adiposos; y tres patrones de utilización de esos combustibles:

- la combustión terminal de glucosa, principalmente en el cerebro,
- la glicólisis que ocurre principalmente en los glóbulos rojos, y
- la utilización de ácidos grasos y cetonas por el resto del organismo.

Integrando estos conceptos con nuestro modelo experimental, si a una persona desnutrida, sometida a períodos de ayuno parcial, y que ha desarrollado una pérdida significativa de su contenido corporal proteínico, se le proporciona una dieta consistente principalmente en carbohidratos, su sobrevida puede ser acortada, ya que desarrollaría un síndrome de kwashiorkor agudo, produciéndose una marcada caída tanto de la actividad como de la concentración de enzimas claves del metabolismo. Ello en razón de que con la glucosa suplida, la necesidad de sintetizar glucosa a partir de las proteínas corporales se reduce, y consecuentemente se presenta una todavía mas modesta liberación de aminoácidos del músculo esquelético hacia el lecho sanguíneo, necesarios para la síntesis de esas enzimas (Young y Scrimshaw, 1971). Esto representa un resultado o consecuencia adversa del “poder protector” de la glucosa sobre las proteínas, que comentamos anteriormente.

Por otra parte, hemos de destacar el papel hormonal durante el ayuno, en principal relación con el papel de la insulina. Su más sensible efecto es, aun a bajos niveles sanguíneos, inhibir la frecuencia de liberación de ácidos grasos libres del tejido adiposo mediante la reducción del AMP cíclico en el adipocito, en oposición al efecto tónico de los nervios simpáticos. También tiene un papel inhibitorio de la proteólisis, incrementando la incorporación de aminoácidos al músculo para la subsecuente síntesis proteínica (Figura 5). En este sentido, el efecto de ahorro nitrogenado y anticetogénico de los carbohidratos sugiere que el mecanismo proteolítico es incluso más sensible que el

anticetogénico al efecto de la insulina de inhibir la liberación de ácidos grasos. En todo caso, en personas bajo ayuno prolongado, sin emaciación o condiciones de desnutrición previa como la referida respecto al Kwashiorkor, sería conveniente el suministro de 100 a 150 gramos de glucosa diarios, a fin de ahorrar el consumo de proteínas para producir esta glucosa como combustible cerebral. Por otra parte, en la medida que disminuye el catabolismo proteínico, la disminución de urea hace menos necesaria la producción de orina y la excreción de agua, por lo que el gasto urinario decrece a menos de 200 mililitros al día, lo cual disminuye a su vez la necesidad de ingesta de agua.

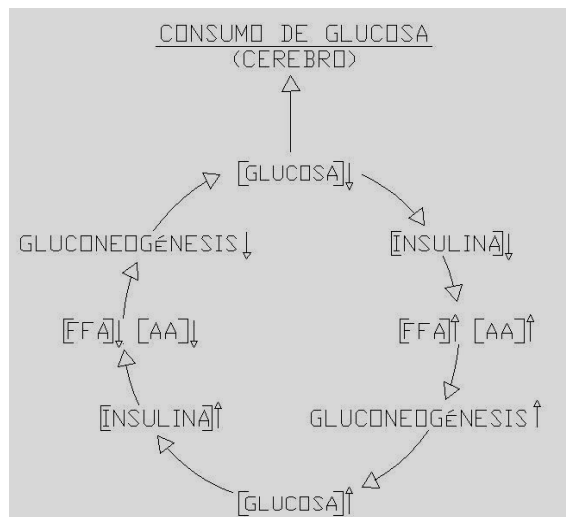


FIGURA 5. Papel inhibitorio de la proteólisis y de la liberación de ácidos grasos de la insulina. **AA**: Aminoácidos; **FFA**: Ácidos Grasos Libres. (Tomado y modificado de Cahill, 1970).

2. Otras consideraciones funcionales.

La velocidad de ganancia de peso está asociada directamente con la velocidad de ganancia de talla sólo en niños cuya dieta es de buena calidad. Sí no, el peso y la talla están relacionados inversamente. De la misma forma, la talla de la madre está asociada directamente con el tamaño de su niño en edad pre-escolar sólo si la dieta es de alta calidad, si no, el potencial genético no se alcanza a la edad adecuada. La disminución de la velocidad de crecimiento corporal debida a la

desnutrición proteínica se comienza a notar a los tres meses de edad postnatal (Lindsay, 1993). El riesgo de desnutrición es mayor antes de los dos años de edad, debido a la alta velocidad de crecimiento, con efectos evidentes tanto sobre los índices antropométricos, como sobre el comportamiento (Riley, 1994; Schurch, 1995).

La desnutrición pre y post-natal tienen efectos diferentes. En el primer caso, se observa bajo peso al nacer y bajo tamaño por edad gestacional. También este tipo de desnutrición tiene efectos sobre la capacidad cognoscitiva cuando se produce antes de las 26 semanas de vida intrauterina. En la desnutrición postnatal, los indicadores antropométricos reducidos coinciden con un menor cociente de inteligencia (IQ) (Wachs, 1995).

Desde el punto de vista de desarrollo neuroconductual, se ha demostrado que existe una relación inversa entre el grado de desarrollo mental y la desnutrición moderada (Simeon y Grantham-McGregor, 1990). Por otra parte, en todas las edades, los niños que presentan un menor crecimiento tienen mayores dificultades para resolver las pruebas cognoscitivas. En los niños de edad pre-escolar, la calidad de la dieta, más que la cantidad de calorías, está relacionada con la habilidad para realizar pruebas cognoscitivas, para interactuar con el medio ambiente y, en especial, con la madre. Según estos estudios, el crecimiento corporal en la edad preescolar es el factor que más pesa para un desarrollo neuroconductual óptimo en la edad escolar. Sí el niño muestra un crecimiento lento a los 18 meses, a los 30 meses todavía presenta un retraso en la realización de pruebas cognoscitivas. Más, sí el suministro de productos animales es insuficiente entre los 18 y 30 meses, a los cinco años el niño todavía presenta problemas neuroconductuales. No se ha demostrado claramente la reversibilidad o no de tales hallazgos (Lindsay, 1993).

A su vez, el cociente de desarrollo (DQ) se define como la relación porcentual entre el comportamiento de un sujeto y el patrón de comportamiento tipo para una edad cronológica determinada. Algunos autores sugieren (Largo, 1993) que la reversibilidad o no del retraso funcional depende de la duración y del grado de desnutrición, además

de la duración del período en el cual la velocidad de crecimiento disminuye, pudiendo haber una posibilidad de rehabilitación alimentaria como exponemos más adelante. Se ha demostrado que el IQ y el DQ tienen un valor menor en niños desnutridos que en los bien alimentados (Connolly y Kvalsvig, 1993).

E. LA ISOCORTEZA CEREBRAL.

1. Organización general y citoarquitectura.

Tal y como señala Rubio (2006), desde el punto de vista embriológico la corteza cerebral adulta comprende tanto la capa de sustancia gris limitada externamente por la piamadre, como la capa de sustancia blanca, de espesor variable, que se extiende hasta el epitelio endimario de la luz ventricular. En esta capa gris, o corteza cerebral propiamente dicha, suele distinguirse citoarquitectónicamente la isocorteza (o corteza con la laminación típica en 6 capas celulares) de la allocorteza, una corteza citoarquitectónicamente más simple, como la corteza olfatoria o la formación hipocámpica. Esta distinción tiene además un fundamento embriológico, ya que cada una de estas grandes regiones corticales derivan de distintas zonas del palio telencefálico. Las neuronas derivadas de éste alcanzan la corteza mediante un proceso de migración radial. A estas células se añaden, mediante distintos procesos de migración tangencial, varias poblaciones, algunas muy numerosas, de neuronas procedentes de otras zonas del palio y especialmente de las eminencias ganglionares del subpalio.

Así, el palio dorsal da origen a la isocorteza, mientras que el palio medial y el palio lateral originan la allocorteza hipocámpica y olfatoria, respectivamente. Igualmente Rubio señala lo establecido por Brodmann's (1909) que en la corteza se observa una capa en posición subpial, denominada molecular, plexiforme externa o capa I, casi desprovista de somas celulares. Profundamente a esta capa se localizan entre 1 y 5 capas más, todas ellas densamente pobladas por somas neuronales de diverso tipo. Más profundamente aún, se

encuentra la sustancia blanca del hemisferio cerebral. En la isocorteza de primates, la sustancia blanca cortical es varias veces más gruesa que la propia corteza. En los roedores, en cambio, la sustancia blanca del hemisferio cerebral es sólo una delgada lámina.

2. Histología de la corteza visual V2L de rata adulta.

La V2L desde el punto de vista de la citoarquitectura, es bastante homogénea (Cenquizca y cols., 2007). Con respecto a la distribución neuronal, las capas desde I-IV, incluyendo la superficie pial, muestran igual patrón laminar, con el mismo grosor que en otras áreas cerebrales tales como la primaria motora o la primaria somatosensorial (Figura 6). Donde se aprecia la diferencia en el grosor cortical es en las capas V-VI, siendo más delgada en la V2 (Skoglund y cols., 1996). La capa I es más delgada que en V1 (Perry, 1980).

En la capa V de la V2L, las neuronas piramidales, son abundantes (en un 80%) con sus características dendritas apicales que se extienden en la Capa I (Perry, 1980). Estas neuronas se concentran en las capas II-III y IV (Parnavelas y cols., 1977; Sefton y Dreher, 1995).

Las neuronas no piramidales (estrelladas) se concentran en las capas I-VI (Sefton y Dreher, 1995). Las células granulares de la capa granular interna ocupan el mayor porcentaje de la lámina IV, pero en menor cantidad que en V1 (Perry, 1980). Las supragranulares o superficiales se concentran en la capa II; las infragranulares o profundas corresponden a las capas V-VI, las cuales son capas de menor grosor que en V1 (Skoglund y cols., 1996). Sin embargo, las aferencias al área V2 representan el 20% del contenido del área, así como el contenido de dendritas pertenecientes a otras capas (V y VI), por lo que el mayor porcentaje lo ocupan las células granulares (Antonini y cols., 1999).

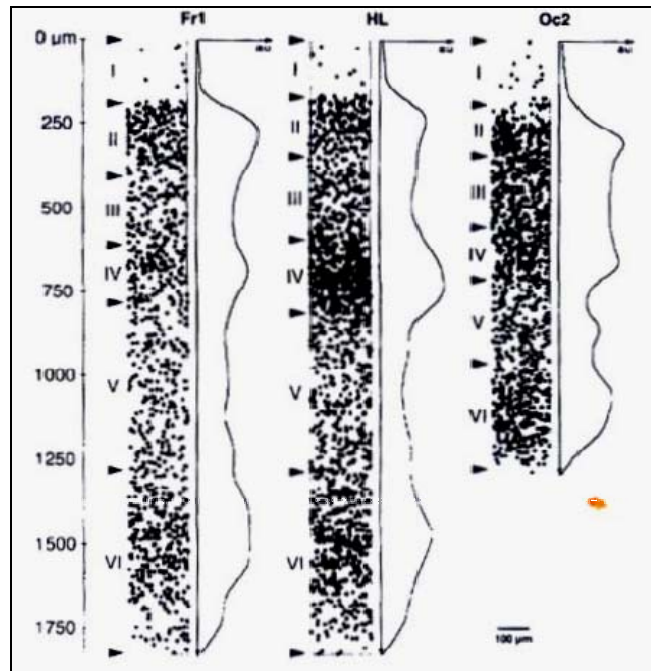


FIGURA 6. Obsérvese la disminución de grosor de la corteza en V2L (Oc2) en las capas V y VI. (Tomado y modificado de Skoglund y cols., 1996).

3. Corteza Visual V2L. Consideraciones funcionales.

La nomenclatura de la isocorteza o neocorteza en la rata se corresponde con la de los primates. Además de los conceptos emitidos por Brodmann (1909), se pueden hallar distintas clasificaciones de la corteza en la literatura. Krieg (1947) adoptó la nomenclatura numérica de Brodmann en la corteza humana, demostrando la homología con la corteza de la rata. Su estudio sistemático produjo importantes datos sobre la conectividad de las diferentes áreas corticales, pero sus resultados no fueron suficientes para una comparación directa con la clasificación de Brodmann. Las homologías de las áreas en las diferentes especies pueden ser evidenciadas por los patrones distintos de las interconexiones anatómicas (Fukuda, 1977; Rosa, 2005).

Otra terminología se basa en las semejanzas entre las áreas corticales de los primates y los roedores, y ha conducido a términos semejantes como “Area Estriada” y “Area Extra-estriada” (Montero, 1973, en Perry 1980; Montero, 1981 en Sefton y Dreher, 1995). Algunas

áreas son subdivididas como la Visual en OC1, en Monocular y Binocular OC1M y OC1B, hoy en día V1M y V1B.

EL área V2L llamada área 18a por Brodmann (1909) (citado en Lorente de No 1938) ha sido demostrada en todas las especies, incluyendo no sólo a los euterios sino a los marsupiales y monotremas. A partir de ese momento, comenzaron verdaderas investigaciones de ontogenia y filogenia tales como los trabajos de Rosa (1999, 2005).

Cada una de estas principales ramas de la evolución de los mamíferos puede ser delimitada por la citoarquitectura, tomando en cuenta como criterios:

- a) Mielinización densa o la condición granular de la capa IV;
- b) La presencia de un simple y sistemático mapa visuotópico o patrones bien definidos de aferentes subcorticales.
- c) Diferentes propiedades de respuestas neuronales. Ejemplo: campos receptivos que tienen conexiones con el borde de la corteza visual primaria (Rumberger y cols., 2001; Rosa y Krubitzer, 1999).

La V2L, como se dijo anteriormente, es el área 18 de Brodmann, 18a en los roedores o la clásica corteza extra-estriada. En su conjunto, puede ser reconocida como un área alargada, por la condición de la forma del cerebro diencefálico de la rata, más pequeña y más mielinizada, medial, anterior y lateral al área 17 o visual primaria, y al área límbica entre V1 y la formación hipocámpica (Rosa, 2005) por encima de la temporal asociativa secundaria (Te2D), detrás de la corteza auditiva asociativa parte rostral (Te3R) (Krieg, 1947; Zilles y Wree, 1995). Los extremos del área están limitados por fibras aferentes tálamocorticales que limitan o circunscriben los límites del área (Antonini y cols., 1999).

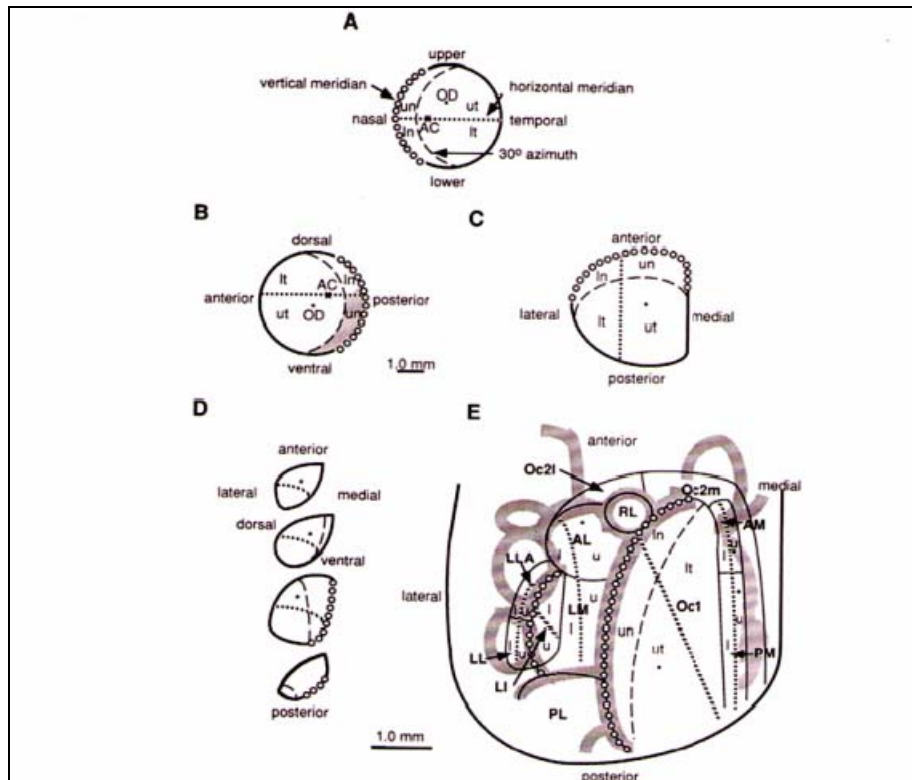


FIGURA 7. Diagrama esquemático de la representación del campo visual del ojo derecho en rata adulta. (Tomado y modificado de Sefton y Dreher, (1995).

A: Representación de corte transversal del campo visual de la retina del ojo derecho de rata adulta vista desde atrás hacia delante.

B: Representación de corte longitudinal del campo visual de la retina del ojo derecho. La imagen se invierte de derecha a izquierda y de superior a inferior.

C: Representación del campo visual del ojo derecho en el colículo superior derecho. Se puede observar que las proyecciones de los axones ipsilateralmente terminan en la región ánteromedial (**un**).

D: Representación del campo visual del ojo derecho proyectado al geniculado dorsal derecho.

E: Representación del campo visual del ojo derecho sobre el área cortical izquierda. Dentro de cada área las subáreas están organizadas visuotópicamente en ánteromedial (AM), pósteromedial (PM) dentro de V2M; ánterolateral (AL), láterointermedia (LI), láterolateral (LL), láterolateral anterior (LLA), láteromedial (LM), y rostrolateral (RL) en V2L. Cada subdivisión contiene una representación del campo visual.

La representación de las conexiones callosales se observan prominentes alrededor de representación del meridiano vertical y son más prominentes en el borde entre V1 y V2L y V2M. En el bode medial de V1 son menos densas.

(**un**): representa el campo binocular y es la región de la retina que desde las células del ganglión retinal proyecta al ojo ipsilateral

ut: Cuadrante temporal superior; u: superior; L: inferior.

•: Localización del Disco Optico (OD)

X: Visión central (AC) representa las células del ganglión retinal o visión central.

Oc2L : V2L (Corteza visual asociativa 2 lateral)

Oc2M: V2M (Corteza visual asociativa 2 medial)

Oc1: V1 (Corteza visual primaria)

Desde el punto de vista topográfico en el límite entre las cortezas V1 y V2 se ubica la línea de Gennari (Malach y cols., 1993), que termina dividiendo a la V2L en polos ventral y dorsal, así como en subáreas o áreas organizadas visuotópicamente que la subdividen en: ánterolateral (AL), láteromedial (LM), láterointermedia (LI), láterolateral (LL) y láterolateral anterior (LLA), a manera de parches (Figura 7). La LM y la LI se unen y forman una imagen en espejo reducida (Rosa, 2005).

Sefton (1995) precisó que, en V1, el campo visual superior, bajo en la retina (Figuras 7A-B), está representado caudalmente (Figura 7E); el campo visual nasal o retina temporal está representado lateralmente (Figura 7E); el meridiano vertical está representado por el borde entre V1-V2; la porción lateral de V1 es el campo binocular; la porción medial de V1 es el campo monocular del ojo contralateral; el ojo ipsilateral se registra en la porción láterocaudal (Figura 7-E).

El objetivo de las últimas investigaciones es aclarar la relación entre la distribución de los meridianos en la retina, tanto verticales como horizontales, y cómo se proyectan a través de la conducción nerviosa a la corteza formando los campos visuales receptivos (retinotopia), tanto en la corteza visual primaria V1 como en V2M y V2L. Es decir, son áreas corticales interconectadas a través de conexiones interhemisféricas que confluyen con los meridianos horizontales (Rosa, 2005). Desde el punto de vista de la organización visuotópica, las proyecciones comisurales se concentran en el tercio lateral del borde entre las áreas LM y AL de la V2L, con lo que están representando el meridiano vertical. Se concentran en las capas profundas y se extienden hacia la porción mediolateral de V1 y V2L. Las proyecciones comisurales en las capas V-VI no conducen colaterales subcorticales. La porción lateral de V1 proyecta a la porción medial contralateral de V2L, para terminar en las capas superficiales (Sefton y Dreher, 1995).

El 65% son proyecciones en feed-back desde la porción láteromedial (LM) de V2L, que corresponden a neuronas piramidales de las capas V-VI, alcanzando en la V1 tanto a las capas superficiales

como a las profundas (Sefton y Dreher, 1995). También desde LM las capas profundas se proyectan a las áreas 13-35 y 36 en el lóbulo temporal (Bai y cols., 2004).

Por otra parte, también se debe tomar en cuenta que la localización de los campos receptivos cambia sistemáticamente, así como la función en el área respectiva de la corteza, creando mapas visuotópicos de campo visual sobre la superficie del cerebro que indican la topografía de las diferentes conexiones en la propia corteza. Así, las áreas de la corteza pueden ser delimitadas por la definición de la extensión de cada mapa visuotópico. Pero debe tomarse en cuenta que la representación es continua, es decir que las proyecciones pueden atravesar las áreas. En este sentido, las configuraciones de los mapas visuotópicos en áreas adyacentes son interdependientes, lo que presumiblemente refleja un importante contraste impuesto por la programación del desarrollo que genera la corteza. Es de lo anteriormente expuesto, que se genera el concepto de solapamiento de las fibras, además de ser organizadas en imagen en espejos simétricos pero de evolución diferente (Rosa, 2005; Malach y cols., 1993).

Malach (1989), propuso los siguientes parámetros con respecto al ordenamiento de las proyecciones en el Area Extraestriada o V2L:

- a) Sus conexiones con las áreas vecinas son más extensivas.
- b) Las aferencias son inmediatamente conectadas.
- c) Las áreas que reciben sus aferencias están directamente interconectadas.
- d) Las proyecciones entre V1 y V2 emergen de zonas funcionalmente parceladas en V1 que establecen zonas separadas con V2 (zonas interareales o de activación de impulsos nerviosos de Rumberger y cols., 2001), así como lo hacen las proyecciones de V1 a V2 a manera de bandas en el primate.
- e) Las proyecciones desde el polo opuesto del área estriada se interdigitan de manera imbricada. El eje de dichas proyecciones se orienta en dirección rostrocaudal sobre la corteza extraestriada.

Funcionalmente, la Corteza Visual V2L se define como una corteza de Asociación de Percepción Sensorial relacionada con los procesos de Aprendizaje y Memoria (Bai y cols., 2004; López Aranda y cols., 2009). Hoy en día, se trata de integrar tanto las áreas primarias como las secundarias de asociación en el concepto de interacción multisensorial integrada. En específico, en el caso de la corteza visual tiene que ver con los campos visuales periféricos así como la localización espacial de los sonidos, pudiendo afectar la percepción de los sonidos hablados y de la sensibilidad auditiva. Por ejemplo, la V2L proyecta a las capas superficiales y profundas de la corteza auditiva primaria (A1), con menos densidad en la capa IV, feed-back córtico-cortical, en contraste con las feed-forward de las proyecciones tálamocorticales que desde el geniculado medial termina en las capas II-IV. A su vez, la A1 puede integrar información con las estructuras subcorticales auditivas.

El concepto de feed-back establece que las neuronas están involucradas en un proceso fisiológico de retroceso del impulso nervioso y cuya finalidad es la de “modular” dicho impulso. Transmiten información en dirección opuesta a la corteza sensorial. Así, las conexiones feed-back de la V2L conducen la modalidad sensorial a las áreas corticales primarias de manera semejante a las respuestas moduladoras de feed-forward, y en algunos casos pueden conducir a la actividad de las columnas en ausencia de las aferencias ascendentes (Smith y cols., 2010).

Las proyecciones interareales de feed-back corresponden a las capas profundas, y presentan como función la modulación de la percepción sensorial (Bai y cols., 2004). Terminan en la capa I, y en menor proporción en las capas II-V de la V1, de la somatosensorial primaria (SI), y A1. Desde las capas superficiales II-III de la V2L se proyectan las proyecciones córtico corticales e interhemisféricas, también en el sentido de feed – back en una relación de 1:2 (Sefton y Dreher, 1995), y en una relación de 1:4 para las feed-forward (Rumberger y cols., 2001; Kaschube y cols., 2008).

Las proyecciones de feed-back desde las áreas somatosensoriales auditiva ventral (Allv) y auditiva dorsal (Alld) son localizadas en todas las capas con excepción de la capa I, y terminan en V2L, en la corteza temporal de asociación (TeA), en la somatosensorial secundaria (SII), y en la parietal insular (PA) (Bai y cols., 2004). También las proyecciones de feed.back van a la A1 desde las capas profundas de V2L tomando la modalidad córtico-cortical (Smith y cols., 2010).

Las proyecciones feed-forward, que literalmente se traducirían como el impulso nervioso “hacia delante”, corresponden en su mayoría a las proyecciones tálamocorticales y llegan a las capas III-IV (Smith y cols., 2010). Las capas superficiales I-II-III de la V1 contactan las dendritas de las conexiones de feed-forward de la misma V1 a manera de conexiones córtico-corticales (Bai y cols., 2004). Las proyecciones de feed-forward también pueden ser interhemisféricas, como las que se dirigen desde las cortezas primarias a las secundarias V2L, Allv, Alld y SII, y pueden conducir axones a la parte profunda de la parte dorsal de la corteza perihirinal (PRh), y a la corteza parietal insular (PA), capas II-III-V (Bai y cols., 2004).

F. DESARROLLO DE LA CORTEZA CEREBRAL.

1. Consideraciones generales.

Este concepto viene íntimamente ligado al concepto de desarrollo, el cual, como bien puntualizó Needham ya en 1931, debe entenderse como un proceso distinto o demarcado cuando se considera al organismo o animal en su vida intrauterina, respecto al animal en su etapa de post parto, tanto desde el punto de vista biológico como bioquímico. En consecuencia, ha de tomarse en cuenta que el desarrollo debe ser considerado como una compleja secuencia de eventos mediante los cuales el embrión – y luego feto – pasa, luego del parto, a convertirse progresivamente en un adulto de vida libre, capaz de sobrevivir en un medio ambiente esencialmente hostil; y estos

cambios dependen de una serie de “alteraciones” subsecuentes en los mecanismos de control celular, de los cuales el crecimiento es la evidencia visible. De hecho, los períodos post natal y de lactancia se caracterizan por una tendencia anabólica y una demanda de alimentación jamás igualada en cualquier otra etapa de la vida, y esto hasta un punto en el cual la constitución de los tejidos alcanza la constancia denominada “madurez química”, siendo a su vez este punto no sincrónico para todos los tejidos y sus componentes a la vez. (Miller, 1969).

Durante el crecimiento y desarrollo de un órgano se pueden describir tres etapas fundamentales, en cuanto a los aspectos morfológicos macro y microscópicos se refiera (Morgane y cols., 1978):

- a) Un período temprano de división celular rápida, llamado hiperplasia, en el cual las células se reproducen, manteniéndose del mismo tamaño.
- b) Un período de división celular lenta con aumento del tamaño celular, hiperplasia más hipertrofia.
- c) Una etapa caracterizada por ausencia de división celular, aunada a un aumento del tamaño y a la diferenciación estructural y funcional de las células.

En relación con lo antes expuesto, Miller (1969) señala las observaciones de Enesco y Leblond, en cuanto al crecimiento de la rata desde su nacimiento hasta los 160 días de edad, lo cual podríamos resumir así (Tabla 1):

Tabla 1

Edad (días)	Peso (g)	Proceso	Tejido
0 a 17	25	Hpl.	Todos
18-48	120	Hpl.↑ + Htr↓.	Visceras↑ / Músc., adip ↓
49 -160	400	Htr.	Visc.↓ / Musc.,adip. ↑
Hpl = hiperplasia. Htr = hipertrofia.			

Predominio de hiperplasia e hipertrofia en los tejidos, según distintas etapas del desarrollo postnatal en la rata. (Miller, 1969).

El cerebro y el tejido adiposo obtienen su población adulta de células comparativamente temprano durante el crecimiento, por lo que determinar el punto en el cual cesa la etapa de división celular será un concepto de gran importancia para determinar la vulnerabilidad del tejido cerebral a trastornos o influencias medioambientales, como lo es la desnutrición. En este sentido, la relación de síntesis de DNA y división celular es estrecha, como lo es, por tanto, la relación entre síntesis de DNA y metabolismo proteínico, como ya lo hemos comentado. Deseamos destacar en este sentido que la mayor parte del crecimiento del cerebro en la rata se lleva a cabo durante los primeros 14 días de edad post natal (P), siendo que el contenido cerebral de proteína con respecto al total corporal es de 6,5% a los 17 días de edad fetal, para decaer a un 3 % al momento del nacimiento; y luego su peso relativo con respecto a la relación con el peso corporal, va decayendo hasta alcanzar prácticamente la relación adulta a los 50 días de edad (P50). Adicionalmente, y en contraste con otros órganos, el cerebro consta de distintas partes morfológicas, y estas diferentes partes se desarrollan a diferentes tasas o patrones de crecimiento y desarrollo (Miller, 1969). Mas aún, tales patrones de desarrollo guardan relación no solo con su patrón ontogénico, sino que también con su patrón filogénico, siendo, por ejemplo, que las células piramidales de la capa III muestran una fase de diferenciación post natal considerablemente mas prolongada, por ser mas jóvenes en este sentido (Schônheit y

Haensel, 1988; Kass, 1995; Rosa, 1999, 2005). Se ha planteado, incluso, que durante el desarrollo las células nerviosas muestran una especie de lucha competitiva por espacio y nutrición, comparando su ontogenia con una especie de selección natural darwiniana (Purves y cols., 1996).

Así, la compleja cronología programada de la ontogénesis cerebral involucra tanto a la adquisición o formación de nuevas células, como a su migración y posterior citodiferenciación (Cordero, 2003).

En relación a la diferenciación de las estructuras que originan el SNC, el tubo neural en desarrollo produce diferentes fenotipos neuronales a partir de un grupo de células precursoras, morfológicamente homogéneas. El desarrollo, sin embargo, no es igual en las diferentes estructuras del SNC.

En el cerebro, la hiperplasia termina más rápido que en otros órganos. No obstante, existen diferencias regionales importantes. Por ejemplo, en la rata, la hiperplasia en el cerebro culmina alrededor de P21, en tanto que en el cerebelo culmina alrededor de los P16-P17; en el tallo cerebral en P15 días y en el hipocampo en P6 (Morgane y cols., 1978).

Se ha definido un corto período llamado fase rápida de crecimiento cerebral ("growth spurt"-GS-) que empieza al final del período de hiperplasia. Durante el GS se desarrolla el árbol dendrítico y axonal, se lleva a cabo la mielinización, se establecen relaciones sinápticas entre neuronas, y se multiplica la glía (Morgane y cols., 1978).

2. El desarrollo postnatal de la corteza visual.

El desarrollo de la corteza visual en la rata ocurre entre la segunda mitad de la gestación y el período postnatal. Las aferentes talámicas procedentes del núcleo geniculado lateral (GNL) llegan a la capa IV de la corteza visual primaria en el primer día postnatal (P1). El proceso de estratificación laminar y la maduración de la extensión del patrón laminar comienza con gran densidad de aferencias desde el tercer día y cuarto día postnatal (P3-P4), (Robertson y cols., 1985-86-87- 90). En esta etapa, los axones continúan la arborización dentro de

la capa IV formando un patrón distinto laminar y, de esta forma, definen su citoarquitectura (Sur y Cowey, 1995). Esto sucede en la capa IV y parte profunda de la III, y con moderada aferencia en las capas I y VI y la subplaca (Kageyama y cols., 1993; Kanold y cols., 2003).

A partir de la etapa antes señalada, se desarrollan diversos períodos no necesariamente escalonados, pero que hemos de comentar por separado, en razón del interés didáctico:

- a) Período de Espera: Es un período en el cual se dice que los axones esperan en la subplaca por un lapso que va de diversos días a semanas. Paralelamente a esto, en la Placa Cortical, a nivel de la capa IV se encuentran gran cantidad de células. Luego de la espera, el crecimiento axonal se renueva para entrar en la corteza y terminar en dicha capa (Kageyama y cols., 1993). En este sentido, señala Rubio (2006) que si bien a este período se le denomina “de espera”, durante este tiempo los axones no parecen estar simplemente “detenidos” en la subplaca, sino que se ramifican con relativa profusión, e incluso diferencian contactos sinápticos funcionales con las neuronas de la subplaca. Aproximadamente el 50% de las neuronas de la subplaca se pierde entre P0 y P40 (Arias y cols., 2002).
- b) Período Crítico de Plasticidad Cortical: En este período, que comienza entre P14 y P15 (apertura de los ojos), las aferencias visuales pueden competir por células postsinápticas dianas que serán las definitivas conexiones tálamo corticales. También se ha demostrado que la acción del factor de crecimiento, NGF endógeno, liberado por estas células diana, es necesario para la función normal y desarrollo anatómico del sistema geniculocortical durante este período (Oppenheim, 1991; Berardi y cols., 1994). Es considerado crítico porque durante él se genera el proceso de apoptosis o muerte neuronal programada, que determina la laminación definitiva y se prolonga hasta P42.

- c) Refinamiento topográfico: Después de este período crítico debe haberse logrado dominancia ocular contralateral y disminución de células binoculares y su consecuente reducción de la agudeza visual. Esta etapa ocurre en el período que se denomina dominancia ocular. Es el período de segregación de axones genículo corticales y la distribución a manera de columnas entre P22-P39 (Antonini y cols., 1999; Gaillard y Sauv, 2006).
- d) Sinaptogénesis: En la rata, el período crítico es seguido por la extensión de sus dendritas y axones. Este proceso, denominado sinaptogénesis, es la principal característica de maduración que se correlaciona con la maduración funcional postnatal en los roedores. Comienza prenatalmente, pero la mayor parte ocurre durante las primeras semanas de la vida postnatal temprana (Aghajanian y Bloom, 1967; Blue y Parnavelas, 1983; Warren y Bedi, 1984; Miller, 1986), puede continuar después del desarrollo temprano (Greenough y Chang, 1988), y puede desarrollar arborización sináptica incluso hasta P60. En P45 la maduración de células corticales del sistema visual y sus propiedades está completada.

Esta etapa es necesaria para la demarcación futura de las diferentes áreas corticales. De aquí que se ha hablado de un “papel instructor del tálamo” en el desarrollo y demarcación de las diferentes áreas y capas corticales, llegándose incluso a señalar un papel instructor desde la zona ventricular (Sur y Cowey, 1995).

G. ASTROGLÍA, DESARROLLO Y CORTEZA VISUAL.

En P4 la mayoría de las células no neuronales en la rata están pobremente diferenciadas, con forma irregular y núcleos muy teñidos (glioblastos). A los pocos días de esta etapa, y en forma progresiva, aumenta el número de células y pueden ser reconocidas como

astroblastos por la presencia de formas distintas de retículo granular (cisternas distendidas con moderado contenido electrodens, y algunas en contacto con la lámina subpial o perivascular de la lámina basal). Los astroblastos se alargan, se desarrollan los procesos y se transforman en astrocitos inmaduros: su núcleo se convierte en pálido, el retículo granular no se extiende más y los filamentos gliales comienzan a acumularse. Ya en P24, predominan los astrocitos maduros con núcleo pálido, filamentos y con baja concentración de organelos a nivel de pericaria, con matriz citoplasmática pálida (Parnavelas, 1983).

Actualmente las evidencias indican que la producción de células gliales y de neuronas comienzan más o menos simultáneamente, pero la producción de células gliales continúa después de cesar la neurogénesis (Jacobson, 1991).

Zilles (1995) ha referido que la Proteína Gliofibrilar (GFAP) aumenta su expresión a medida que se desarrolla el animal, manteniendo sus niveles a partir de P21; y que, por otra parte, las células astrocitarias se mantienen inmaduras en las capas intermedias donde dependen de las aferencias tálamocorticales. Este autor indica además que la maduración en la corteza visual se debe a la experiencia visual. Por otra parte, Parnavelas (1983) observó que entre P16 y P24 hay formas inmaduras de astrocitos, siendo muy abundantes en la edad de P40.

En este sentido, hay que tomar en cuenta la interacción neurona-glía, a la cual se le atribuye una considerable significancia funcional tanto en el desarrollo como en la maduración del circuito neuronal, siendo que, de hecho, la luz estimula la maduración astrocitaria (Hawrylak y Greenough, 1995; Gomes y cols., 1999).

Esta interacción neurona-glía podemos resumirla de la siguiente manera:

- a) La culminación del desarrollo astrocitario se alcanza después de la culminación de la maduración neuronal. Los astrocitos

inmaduros regulan la maduración neuronal, y viceversa. Es un mecanismo bidireccional neurona- glía (Stichel y cols., 1991).

- b) Los astrocitos se diferencian en etapas más tempranas que los oligodendrocitos y la microglia. Sin embargo, su densidad con respecto a la ocupación en el neuropilo es mayor para los oligodendrocitos que para los astrocitos en la corteza visual primaria y en el geniculado dorsal. Por otra parte, su distribución se debe más a la función que desempeña cada tipo de célula glial que a su número (Leibnitz y cols., 1982; Sikes, 1981).
- c) En el cerebro maduro, los astrocitos a través de las uniones estrechas contribuyen con la compartimentalización del metabolismo del pool de neurotransmisores tipo glutamato, GABA, acetilcolina y neuropéptidos, así como con el desarrollo de los receptores y canales iónicos, para la activación del segundo mensajero intracelular, contribuyendo, por tanto, con el mantenimiento de la homeostasis iónica así como con la inactivación de la neurotransmisión, neurogénesis, migración y, en las etapas postnatales, la formación de circuitos sinápticos (Stichel y cols.,1991; Hatton, 2002; Araque y cols.,2001; Sutor y Hagert,2005).
- d) Los astrocitos ocupan espacios entre las neuronas, y más específicamente entre las espinas dendríticas y botones sinápticos, como puede observarse en la región CA1 del hipocampo, con sobreposición en su ocupación de los espacios interneuronales (circuito trisináptico) (Hatton, 2002; Cenquizca y cols., 2007).
- e) Además de filamentos intermedios, los astrocitos también expresan microfilamentos de actina junto con muchas proteínas de puentes de actina. Los filamentos de actina se hallan asociados con el citoesqueleto y la membrana plasmática. Esto muy

probablemente explica la capacidad de los astrocitos para extender y retraer sus procesos y prolongaciones en respuesta a la activación de receptores, como los beta-adrenérgicos, que influyen la actividad de la adenil ciclasa y la acumulación del AMPcíclico. Los dos conceptos anteriores apuntan hacia la noción de que los astrocitos regulan la plasticidad sináptica en la corteza visual y otras áreas cerebrales, durante el desarrollo, modificando su estructura morfológica. (Hatton, 2002).

- f) La astrogliosis es el principal sitio de almacenaje de glicógeno cerebral (Stichel y cols., 1991; Magistretti y Pellerin, 1996).

Finalmente, deseamos destacar el hecho observado por Jacobsen y Miller (2003), en cuanto a la importancia que tendrían los factores medioambientales en la regulación de la migración astrocitaria a través de la corteza en desarrollo; y en cuanto a la diferencia que existe en el patrón mas acelerado de migración de estas formas celulares en las ratas en desarrollo mas jóvenes (primera semana post natal), con respecto a las de mas avanzada edad. Dentro de estos factores “medio ambientales” estos autores señalan la injuria y la enfermedad, y nosotros añadiríamos: la alimentación; tal y como lo destacan Bhide y Bedi (1984).

H. OLIGODENDROGLÍA Y MIELINIZACIÓN.

En la rata la mielinización es un proceso que ocurre en el período postnatal en los oligodendrocitos, células responsables para la síntesis de mielina en el Sistema Nervioso Central. Además, el 80% de los oligodendrocitos toman contacto con los vasos sanguíneos, pericarion, dendritas y axones (Leibnitz y cols., 1982), y forman grandes cantidades de membranas especializadas que envuelven a los axones y compactan las láminas de mielina. En este animal, el proceso se desarrolla en dos etapas: la primera es un período de proliferación y desarrollo de los oligodendrocitos que ocurre en las dos primeras

semanas de vida postnatal. Este es seguido de un periodo de rápida síntesis de mielina y depósito de la misma que comienza entre los días P11-P14. El mayor nivel de síntesis es cerca del día P18 y declina lentamente en la edad adulta. Esta secuencia de eventos difiere de un área a otra en cuanto al tiempo de realización de las dos etapas.

Este proceso depende tanto de las propiedades intrínsecas de las células como de señales extracelulares. La interferencia en este orden de secuencia puede no solamente retardar el proceso sino que hasta producir cambios irreversibles, para lo cual influye no solamente la naturaleza del daño sino su tiempo de acción, que es aún más importante.

Por otra parte, el tiempo de desarrollo de la mielina es bien conocido, pero lo importante es conocer las señales que regulan la proliferación y la diferenciación de los oligodendrocitos, tales como la síntesis y el conjunto de los componentes mielínicos.

La diferenciación de los oligodendrocitos de una célula progenitora inmadura a un oligodendrocito maduro depende de un proceso de alta regulación de secuencias, a lo largo de vías de linajes caracterizados por la expresión de proteínas específicas y lípidos.

Los precursores pueden ser identificados en su superficie: el anticuerpo antigangliósido A2B5 y el anti-GD3; mientras que la etapa temprana de su maduración puede ser identificada por el anticuerpo de galactocerebrósido. Los oligodendrocitos maduros expresan la proteína de la mielina tales como la Proteína Básica de Mielina (MPB), la Proteína Proteolítica (PLP), la Glicoproteína Asociada a la Mielina (MAG), la Proteína Mielínica de los Oligodendrocitos (MOG), y la 2'-3'-Cyclonucleótido-3'-Fosforilasa (CNP), en este orden de secuencia.

Entre las causas de interferencias se encuentran la deficiencia nutricional y los trastornos del metabolismo lipídico. Cuando la causa es la nutrición se observan los cambios en el período postnatal. La desnutrición hipoproteínica causa hipomielinización en el cerebro. Los cambios en el déficit de mielina son irreversibles, siendo mayormente afectada en el período de síntesis de la membrana de mielina desde

P8-P14. En consecuencia, se reduce el número de axones a pesar de que el número de oligodendrocitos no varía en el cerebro. El mecanismo molecular involucra el retardo en la coordinación de la impregnación de los genes combinados con la supresión de la activación genética de la mielina. Se piensa que puede estar involucrado el factor de crecimiento insulina similar 1 (IGF-1), ya que se ha observado que este factor aumenta el número de oligodendrocitos, y por ende la cantidad de mielina que se produce (Di Biase y Salvati, 1997).

En cuanto a los trastornos del metabolismo lipídico, se está haciendo cada vez más evidente que los lípidos de la dieta cumplen un papel importante en la mielinogénesis, ya que su deposición y metabolismo están íntimamente conectados con la biogénesis de la mielina. Su importancia es sugerida por el hecho de que si estas moléculas no se encuentran disponibles o son bloqueadas metabólicamente, puede ocurrir amielinización, dismielinización o demielinización, sobre todo en la fase mas activa de síntesis de mielina. Las fuentes potenciales de lípidos en el sistema nervioso son o la síntesis *in situ* o su incorporación desde fuentes exógenas, sobre todo en la primera fase de la vida post natal, período en el cual la síntesis de lípidos es particularmente relevante. De hecho, los lípidos exógenos pueden interferir con los lípidos endógenos disparando mecanismos que regulan el proceso de mielinogénesis (Di Biase y Salvati, 1997).

I. DAÑO CEREBRAL POR DESNUTRICION PROTEINICA Y EFECTOS DE LA REALIMENTACION EN MODELOS ANIMALES

Largo (1993) sugiere que la reversibilidad o no del retraso funcional depende de la duración y del grado de desnutrición, además de la duración del período en el cual la velocidad de crecimiento disminuye.

Los hallazgos de este autor permiten dividir los efectos de la realimentación o rehabilitación alimentaria sobre el crecimiento corporal, en tres tipos de respuesta:

- a) La velocidad de crecimiento aumenta cuando cesa la restricción alimentaria y alcanza rápidamente la velocidad normal.
- b) El retardo en la velocidad de crecimiento se mantiene después que ha cesado la restricción alimentaria, pero el período de crecimiento tiene mayor duración, tal que compensa la deficiencia.
- c) Un tipo mixto estaría en el medio de las dos anteriores.

En este sentido Angulo-Colmenares y sus colaboradores (1979) ya habían observado que las crías de ratas sometidas a una dieta hipoproteínica del 8% de caseína durante el embarazo, mostraban a la edad de 20 días de nacidas y comparadas con el grupo control, alteraciones en cuanto al peso corporal y aspectos estructurales como la longitud ántero-posterior, el ancho y la altura de los hemisferios cerebrales, así como el grosor del área S1 de la corteza cerebral, el volumen de tejido cerebral ocupado por el neuropilo en las capas II y IV, el volumen de los cuerpos celulares de esas capas, el volumen estimado y el grosor de sus dendritas basales. Sin embargo, en las ratas realimentadas, a P40 ya no se observó diferencia significativa de los cambios señalados. Tales resultados sugirieron que los animales severamente desnutridos, hasta P20, pueden alcanzar peso corporal normal y tamaño cerebral normal cuando se provee la alimentación adecuada a partir de esa edad, aunque Desai (1996) señala que el retorno a la dieta óptima luego de P21 (destete) no corrigió los déficit corporales que sí se corrigen si se comienza en P0 a pesar de haberse provocado una dieta hipoproteínica a la madre durante la etapa prenatal. De aquí que este autor concluya diciendo que es el período postnatal más bien que el prenatal, el que es crítico desde el punto de vista de crecimiento en general. En todo caso, ha de tomarse en

cuenta la observación hecha por Warren (1985), en el sentido de que el cerebro así como el globo ocular, fueron los órganos menos afectados en cuanto a reducción de peso inducida por desnutrición en ratas desde P0 a P100.

También se ha señalado que mientras a más temprana edad se comience la desnutrición y mayor tiempo se prolongue, más difícil será la rehabilitación nutricional. De hecho, el efecto deletéreo de la desnutrición sobre el crecimiento y orientación de las dendritas apicales de las células piramidales atípicas persistió en la adultez y no pudo ser revertida por rehabilitación nutricional a pesar de haberse comenzado tan temprano como P10 (Cordero, 2003). Esta misma autora así como Schônheit (1988) y Ragsdale (2001) señalan que ha de tomarse en cuenta el efecto diferente que produce la desnutrición, así como la rehabilitación, en las distintas estructuras cerebrales, según su más reciente aparición desde el punto de vista filogenético, siendo por ejemplo las neuronas piramidales de la capa III más susceptibles de sufrir mayor retraso de crecimiento por desnutrición, aunque a su vez muestran mayor incremento en crecimiento y diferenciación como respuesta a la rehabilitación nutricional. Igualmente Warren (1984) señala que el efecto de la desnutrición sobre la relación sinapsis-neurona, puede revertirse si se mantiene el período de rehabilitación por un tiempo prolongado.

IV. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

A. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Existe una disminución real del número total de neuronas y astroglia en la etapa de proliferación durante el desarrollo de la corteza visual V2L de rata, inducida por dieta hipoproteínica isocalórica. Durante la etapa de realimentación estos cambios revierten parcialmente.

B. OBJETIVOS

Para verificar la hipótesis planteada, se proponen los siguientes objetivos:

I- Comprobar si la población neuronal y glial del área V2L se ve influenciada por alguna de las siguientes condiciones:

- a) Desnutrición y realimentación proteínica inducida.
- b) Tiempo durante el cual se efectúan dichos cambios en el período postnatal.

II- Determinar los cambios producidos en el área V2L en los siguientes parámetros:

- a) Pesos corporal y cerebral de las ratas sometidas a las distintas etapas experimentales.
- b) Cambios cuantitativos durante el proceso de maduración en ratas desnutridas en diferentes estadios después del nacimiento ($\leq P30$, $> P30$) con respecto a los controles en el volumen de la corteza cerebral, volumen de V2L, volumen promedio neuronal, densidad numérica y número absoluto de neuronas y astrocitos.

- c) Reversibilidad de los cambios cuantitativos indicados, en la corteza visual V2L en ratas desnutridas a partir de las condiciones de desnutrición ya establecidas y realimentadas con dieta de 25% de contenido proteínico, desde P0 y desde P21.

V. MATERIAL Y METODOS

A. LA CORTEZA VISUAL DE RATA COMO MODELO EXPERIMENTAL

Se han desarrollado otros modelos experimentales en ratas (Krettek y Price 1977; Van Eden C.G.&Ulyngs H.B.M.,1985 a y b; Madeira y cols.,1990; Warren y Bedi,1990; Bisiacchi y cols., 1997). Estos animales alcanzan la madurez sexual entre los 37 y 67 días de edad para las hembras, mientras que para los machos ésta se alcanza un poco más tarde. El ciclo estral dura 4-6 días y el período de lactancia dura aproximadamente hasta el día 21 de postparto, siendo en la última semana de este período que se producen los principales cambios en el desarrollo del cerebro de las crías (Rocha de Melo y Guedes, 1997). Una cría de rata de 50 gramos de peso requiere de 10 a 20 gramos de alimento diario, y no sintetiza ni aminoácidos esenciales ni vitamina B, los cuáles deben administrarse con la dieta (Collins, 1990).

En el presente trabajo se escogió a la rata porque su sistema nervioso, en general, y su corteza cerebral en particular, están muy inmaduros al nacer y su proceso de maduración anatómica y funcional se completa durante el período postnatal. Su desarrollo dendrítico ocurre desde la primera semana postnatal. La finalización del período de gestación en la rata es en el día 21 (E21) que corresponde a los 9 meses de gestación en el humano. En esta etapa, el período de la sinaptogénesis, con lo cual culmina su desarrollo (Cragg, 1972) ocurre a la tercera semana post natal en la rata (P21) que corresponde al tercer mes de gestación en el humano. Se ha establecido que la rata recién nacida equivale a un feto humano de 18 semanas (Morgane y cols., 1978). Los cambios de peso cerebral en el humano entre 15.5 y 20 meses corresponden proporcionalmente en la rata entre 13 y 17.5 días postnatales (Dyson y Jones, 1976). El día 28 postnatal en la rata corresponde a los 24 meses en el humano (Cordero, 2003).

Por otra parte, la corteza visual primaria (V1) de la rata constituye un modelo de estudio en el desarrollo cerebral, actividad neuronal y desarrollo de conexiones (Roberts. y cols., 1985-86-87- 90; Zilles y Wree , 1995; Antonini y cols., 1999).

Durante casi medio siglo ha sido muy bien estudiada morfológica y electrofisiológicamente y, además se ha estudiado en modelos de desnutrición severa (Cragg, 1972), aunque, de manera específica no ha sido así con la corteza visual V2L, cuyas ventajas para tomarla como objeto de la presente investigación resaltaremos en nuestra discusión.

B. MATERIAL

1. Animales de experimentación.

Se tomaron 40 ratas hembras maduras jóvenes, Sprague- Dawley, con peso promedio de 200 gramos que fueron sometidas a dietas isocalóricas con un contenido en proteínas de 25 % (controles) y de 6% (desnutridas) respectivamente. La dieta se mantuvo durante 5 semanas previamente al acoplamiento con macho adulto joven, alimentado con dieta estándar. Se obtuvo un total de 2 camadas, se escogieron por cada camada 5 ratas para el grupo control (N) y 15 para el grupo con dieta proteínica al 6% (DN), ya que las ratas desnutridas son menos fértiles, producen menos crías y tienen una mayor incidencia de canibalismo, las crías son menos saludables y frecuentemente mueren recién nacidas. Las dos camadas se planificaron con una diferencia de seis meses cada una. Durante la gestación (3 semanas) se mantuvo la alimentación a libre demanda, colocando el pienso en una vasija de 150 gramos de capacidad. Se anotó el día del nacimiento de las crías en cada jaula. Se dejaron 10 crías por cada madre, de acuerdo al número de tetillas por cada madre. El resto de las crías se desechó y la lactancia se mantiene a libre demanda. A los 21 días se realizó el destete. Se escogieron al azar las crías que se realimentaron con dieta proteínica al 25% o grupo realimentada (RA). Un conjunto de animales del grupo RA se realimentaron a partir de P21 (21 días postnatales), momento del

destete. Para conseguir la realimentación desde P0 (al nacimiento) de los restantes animales del grupo RA, se alimentaron las madres después del parto con dieta de proteína al 25%.

Se estudiaron un total de 59 cerebros de crías de ratas, 25 hembras y 34 machos, de las cuales, un promedio de 10 animales por cada grupo nutricional (N, DN, RA) fueron sacrificados en edades comprendidas entre P25 y P30 (grupo de ≤ 30 días de edad), mientras que las restantes ratas se sacrificaron a edades comprendidas entre P30 y P42 (grupo de > 30 días de edad).

Todo el procedimiento descrito se realizó en el Animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid. Se mantuvieron en ambiente controlado (20° - 22° C de temperatura y 45-55% de humedad relativa) sometidas a ciclos de 12 horas de luz y de oscuridad cada día.

2. Alimentación.

El desarrollo y preparación de las dietas fue realizado por la compañía Harlan Interfauna®, Barcelona, España, de acuerdo con la composición que se anexa (Tabla 2) según formulación elaborada por la Doctora Irma Herrera del Departamento de Investigación del Instituto Nacional de Nutrición, Caracas, Venezuela. La dieta al 6% es hiperglúcida, la diferencia de proteínas es compensada con carbohidratos, igual a lo que sucede en los grupos sociales con desnutrición, donde la falta de proteínas es compensada por exceso de carbohidratos. La dieta se preparó por lotes, con el fin de evitar la contaminación, y se guardó en nevera (4° C). Se dio a libre demanda.

Tabla 2

INGREDIENTES	DIETA DN 6% Proteínas (grs)	DIETA N / RA 25% Proteínas(grs)
lactoalbúmina	7.69	32.05
aceite de maíz	6.00	6.00
vitaminas	1.00	1.00
sales minerales	3.50	3.50
almidón,cps	81.81	57.45
total	100.00	100.00

Composición porcentual de las dietas

Ambas dietas son isocalóricas, es decir, aportan 4Kcal / g de alimento, a expensas de la proporción de carbohidratos (almidón de maíz 81,81% y 57,45%), 6% de lípidos (aceite de maíz), el 1% de vitaminas y el 3.5 % de sales minerales

INGREDIENTES POR KILO

Vitaminas:

- A: 20.000 UI
- D3: 2050 UI
- E: 90 mg (L tocoferol)
- B1: 5 mg
- B2: 8 mg
- B6: 5 mg
- B12: 0,06 mg
- K3: (bisulfito de sodio de menadiona): 5 mg
- NIACINA: 4 mg
- ACIDO FOLICO: 2 mg
- AC. D PANTOTENICO: 40 mg
- BIOTINA: 0,4 mg
- VITAMINA H1: 100 mg
- COLINA: 2000 mg

Oligoelementos (*):

- Fe (Citrato de Fe) 25 mg
- Mn (Monohidrato de Sulfato de Manganeso) 15 mg
- Zn (Carbonato de Zinc) 11 mg
- Cu (Sulfato Cúprico) 7.5mg
- KI O₃ (Iodato de Potasio) 0.62 mg

(*) Tomado de la composición de sales minerales de Williams–Briggs, modificado al 3.5%.

3. Área cerebral escogida.

Se escogió el Area Visual V2L por ser una corteza bastante uniforme en toda su extensión, así como ser una parte del sistema visual muy bien documentada y discutida en muchos aspectos de la Neurociencia (Laemle y Sharma, 1986; Malach y cols., 1989, 1993; Zilles y Wree, 1995; Rosa y Krubitzer, 1999; Rumberger y cols., 2001; Rosa, 2005), pero poco estudiada en el tema de la nutrición / desnutrición.

Con respecto a las edades escogidas P25 y P30, son las más adecuadas para medir los cambios en el número de neuronas y glía tanto en los controles y desnutridas, como en la realimentación inducida tanto desde P0 como desde P21. En P42 se produce la finalización del proceso de desarrollo de las conexiones tálamocorticales en la rata (Roberts., 1985-86-87- 90; Zilles y Wree, 1995); que puede prolongarse hasta P60 en el ratón (Antonini y cols., 1999).

4. Coordenadas utilizadas.

Los límites anatómicos de V2L se fijaron del modo siguiente:

Se tomó en cuenta la relación topográfica del Area V2L con: el polo del núcleo geniculado dorsal, la finalización del núcleo posterior

del tálamo (PO) y el CA1 del hipocampo. La V2L se ubica súpero-lateral a CA1 y al Forceps Mayor del Cuerpo Calloso.

Las coordenadas utilizadas para seleccionar la zona donde realizar los contajes neuronales y de astrocitos se tomaron del Atlas de Paxinos y *Watson*, 1998, desde el interaural (IA) de 4.20mm hasta el interaural (IA) 1.70mm (Paxinos y Watson, 1998: Figuras P39-P49).

C. METODOS.

1. Protocolo de extracción de muestras.

Los animales han sido criados y posteriormente manipulados ateniéndonos a las normas bioéticas de los organismos internacionales (Declaración de la AMM, 1989) de la Unión Europea (Directiva del Consejo, 1986; Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo, 2003), del Estado Español (Real Decreto 1201/2005) y de La Comunidad Autónoma de Madrid (Orden 4 de agosto 1989).

Las crías fueron pesadas y luego de haber sido sacrificadas se obtuvo el peso cerebral en todos los grupos de animales. La extracción de los cerebros de las ratas se hizo por decapitación, previa anestesia con pentobarbital sódico (70 mg/kg-Dolethal). Se extrajo el cerebro mediante disección cuidadosa, previo levantamiento de la tabla craneal y de la duramadre.

2. Procesamiento de las muestras.

Los cerebros se pesaron y se fijaron por inmersión en una solución de paraformaldehído al 10% en PBS (buffer fosfato salino) a pH 7.4 durante 72 horas. A continuación, se tallaron los cerebros desde el plano coronal medio hacia la parte posterior, en rodajas coronales de 2 mm de grosor que se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente, y posteriormente se incluyeron en parafina, empleando un procesador automático de tejidos.

En cada rodaja coronal se efectuaron cortes histológicos a 4 μ m de grosor con un microtomo Leitz. Sobre esos cortes se efectuaron técnicas de tinción con Hematoxilina y Eosina y técnicas inmunohistoquímicas. Los cortes fueron fijados a portaobjetos con Poly-L- Lisina.

3. Métodos de tinción

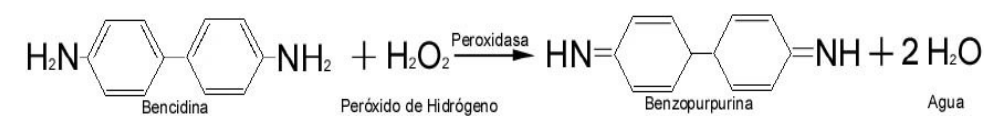
a. Inmunohistoquímica. Método de avidina-biotina peroxidasa

Los métodos inmunohistoquímicos sirven para detectar antígenos celulares o tisulares y se basan en la reacción inmunológica de antígeno-anticuerpo. Para visualizar el lugar donde ocurre la reacción antígeno anticuerpo es preciso emplear un marcador o trazador con el fin de conseguir la inmunolocalización. En este trabajo el marcaje se ha realizado con la enzima peroxidasa. El lugar de la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato de la enzima más un cromógeno (diaminobencidina en nuestro caso).

El producto originado al actuar la enzima sobre el sustrato interacciona a su vez sobre el cromógeno y da lugar a un precipitado insoluble y coloreado.

El método de la bencidina consiste en la aparición de un precipitado de color azul-verdoso debido a la formación de benzopurpurina tras la descomposición de la bencidina en presencia de peróxido de hidrógeno y por acción de la enzima peroxidasa. El inconveniente que tiene esta reacción deriva de la inestabilidad de la benzopurpurina. Para solventarlo, se sustituye la bencidina por un derivado suyo; la 3,3'-diaminobencidina la cual proporciona pigmentos polimerizados de color pardo de mayor estabilidad. Se recomienda extremar las precauciones en su manejo por su posible potencial carcinogénico.

El esquema de la reacción se representa a continuación:



El método inmunohistoquímico utilizado en este trabajo es un método indirecto. Mediante este procedimiento, el anticuerpo primario sin conjugar se une con el antígeno presente en la sección de tejido. En una segunda fase se añade un anticuerpo secundario que en una tercera fase se conjugará con el marcador enzimático. Se ha utilizado

el anticuerpo secundario biotinilado. La razón estriba en que las moléculas de biotina tienen gran afinidad por las moléculas de avidina de forma que se generan fuertes enlaces no inmunes entre sí. A su vez la molécula de avidina está formada por cuatro subunidades que configuran una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas de unión a la biotina.

Por otro lado, la biotina a su vez se conjuga fácilmente de forma covalente con anticuerpos y marcadores. Se considera que pueden unirse hasta 150 moléculas de biotina a una sola molécula de anticuerpo. Aunque la avidina también tiene una gran capacidad de combinarse con anticuerpos, es la biotina la que normalmente se conjuga debido a su pequeño tamaño.

En este trabajo se ha aplicado un complejo de avidina y marcador enzimático biotinilado que contiene lugares de unión libres en la avidina para que se produzca la fijación sobre el anticuerpo secundario biotinilado (método del complejo avidina-biotina-peroxidasa).

En la Figura 8 se muestra un esquema detallado del método inmunohistoquímico utilizado:

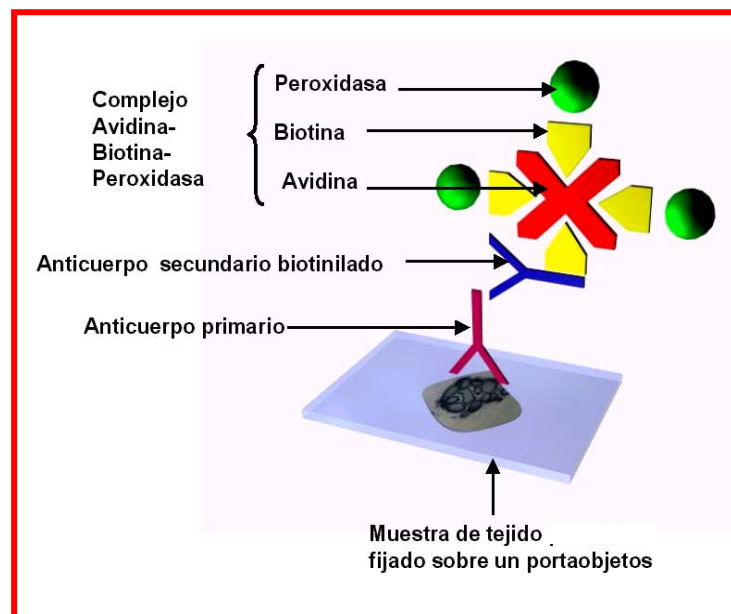


FIGURA 8. Método Inmunohistoquímico Indirecto.

Los anticuerpos primarios utilizados en el estudio se muestran en la Tabla 3

Tabla 3

ANTIGENO	ANTICUERPO	DILUCION	FUENTE
NeuN	Monoclonal	1:100	Chemicon International USA
GFAP	Monoclonal	1:400	Sigma, S. Luis, USA

b. Inmunotinción para NeuN

El anticuerpo monoclonal utilizado (mAbA60), reconoce en el sistema nervioso de los vertebrados una proteína nuclear específica denominada NeuN (Neuronal Nuclei) (Mullen y cols., 1992; Arias y cols., 2002).

NeuN se expresa casi exclusivamente en el sistema nervioso. Aparece durante la etapa del desarrollo y permanece en el adulto. Se manifiesta en ratón, rata, pollo, salamandra y el humano. El NeuN parece ser un marcador de la maduración y diferenciación neuronal tanto in vivo como in vitro.

c. Inmunotinción para la proteína gliofibrilar (GFAP)

En el sistema nervioso de los mamíferos hay evidencia de un grupo de proteínas, constituyentes de filamentos intermedios (IF) que participan en la conformación del citoesqueleto de la célula nerviosa junto con microtúbulos y microfilamentos (Kandel y cols., 2000). Los IF tienen un diámetro de 10nm y son estructuras dinámicas que intervienen en los procesos de desarrollo (Angelides y cols., 1989; Durham y cols., 1989). Las principales IF localizados en el sistema nervioso son los neurofilamentos y los gliofilamentos. Los gliofilamentos, presentes en los astrocitos, están constituidos por una proteína de 50kDa, denominada proteína ácida gliofibrilar (GFAP), del inglés: Glial Fibrillar Acidic Protein (Osborn y Weber, 1986; Paz y cols., 1991). El anticuerpo es una IgG, epítipo de ratón, que detecta en las células astrocitarias la proteína GFAP (Boenisch y cols., 2001).

4. Sistemática de la inmunohistoquímica

a) Desparafinado y rehidratación de los cortes:

Las secciones de los tejidos, una vez rehidratadas en serie de alcoholes de concentración decreciente y agua destilada, se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.3% en agua destilada durante 30 minutos con el fin de inactivar la peroxidasa endógena. A continuación se pasan nuevamente los cortes por agua destilada y tres lavados de PBS de 5 minutos cada uno.

En algunas ocasiones el antígeno está presente en el tejido estudiado pero no puede reaccionar con el anticuerpo específico porque está enmascarado por otras moléculas. Esto sucede en el caso de la inmunohistoquímica para NeuN. Para conseguir el desenmascaramiento, después de la inactivación de la peroxidasa endógena y del lavado en agua destilada, se introducen las preparaciones en una cubeta con buffer citrato pH 6, en baño de María calentado en un microondas marca Superser, modelo: MSA-211, durante un minuto y 30 segundos a una potencia de 350 vatios. Luego se pasa la cubeta a un baño de agua a temperatura ambiente y se deja enfriar durante 20 minutos. Después de enfriar, se lavan los cortes en PBS, tres lavados de 5 minutos cada uno.

b) Uso de bloqueante:

Se toman las preparaciones, se seca alrededor del tejido y se aplica el Bloqueante Universal (Zymed, S. Francisco, CA, USA). durante 10 minutos.

c) Incubación con el anticuerpo primario:

El antisuero se diluyó a 1:400 (GFAP) y 1:100 (NeuN) en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS pH 7.4, más azida sódica al 0.1%. A continuación las preparaciones se incubaron con el anticuerpo primario durante 12 horas en cámara húmeda a 4 °C.

d) Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado (Zymed):

Es un anticuerpo que reacciona contra el anticuerpo primario y está unido a biotina, una molécula de pequeño peso molecular. La biotina reacciona específicamente con una proteína llamada avidina. La incubación se efectuó durante 10 min a temperatura ambiente.

e) Incubación con el complejo Avidina–Biotina Peroxidasa (Zymed):

Los cortes fueron tratados con un complejo streptavidina-biotina-peroxidasa durante 10 min en cámara húmeda a temperatura ambiente.

f) Revelado con 3,3'-Diaminobenzidina Tetrahydrochloride (DAB):

Se disuelven 100 mg DAB (Sigma, Barcelona, España) en 200 cc. de PBS y se le añaden 40 µL de agua oxigenada al 30%. El tiempo de incubación es variable, desde 30 segundos a 10 minutos. En nuestro caso fue de 3 minutos. Se debe ir controlando con un microscopio.

La peroxidasa es responsable de la oxidación de la DAB, que adquiere un color marrón y se torna insoluble en agua, alcohol y xileno, y se puede visualizar al microscopio. Se procede a pasar las preparaciones por PBS durante 5 minutos, y luego por agua destilada durante 5 minutos más.

g) Contraste nuclear:

Se realiza con la Hematoxina de Harris durante unos segundos. Luego se realizan lavados en agua corriente. En nuestro caso, sólo se utilizó el contraste nuclear en la inmunotinción para GFAP.

h) Deshidratación y montaje:

Finalmente, las preparaciones se deshidrataron en serie creciente de concentración de alcoholes, se pasaron por xileno y finalmente se montaron en Depex (Serva Heidelberg, Alemania).

D. MÉTODOS CUANTITATIVOS

1. Breves consideraciones teóricas acerca de la cuantificación estereológica de la densidad numérica y del número absoluto de partículas.

Para conocer el número de células (ya sea en términos relativos, densidad numérica o número de células por unidad de volumen, o en términos absolutos, número total de células por órgano), las hemos de cuantificar empleando técnicas estereológicas (Howard y Reed, 1998, 2005), y entre ellas el principio del disector óptico (Bjung, 1993; Bjung y Gundersen, 1993)

La estereología es la ciencia que permite cuantificar en tres dimensiones a partir de mediciones efectuadas en muestras de dos dimensiones (cortes histológicos).

El disector es un paralelepípedo de dimensiones conocidas situado entre dos planos paralelos llamados plano de referencia y plano de observación, que están separados por una distancia prefijada. El disector óptico es una sonda de medida virtual que se introduce en el interior del tejido en estudio, en el que queremos contar un tipo de partículas de unas determinadas características.

El tejido se encuentra en forma de corte histológico (bidimensional) con un grosor determinado (3ª dimensión). Cuando se coloca el corte en el microscopio óptico y se observa con el objetivo de inmersión, lo primero que se debe hacer es enfocar hasta conseguir ver algo nítido, bien una partícula completa o parte de ésta; en ese momento se está en el plano de referencia. Moviendo el tornillo micrométrico, las imágenes enfocadas irán perdiendo nitidez, pero otras alejadas del plano de referencia se irán enfocando. La distancia entre los dos planos focales definirá la tercera dimensión del disector (eje Z). Sólo se cuentan las partículas dentro de este paralelepípedo virtual siguiendo los criterios de inclusión y exclusión de Sterio (Sterio, 1984). Además, sólo se cuentan una sola vez (Howard y Reed, 1998,2005; Bjung, 1993)

El disector óptico permite registrar como una sola unidad partículas que por su forma o tamaño corten el plano de observación por múltiples lugares, como neuronas o vasos sanguíneos; así, si se partiera de la suposición de que cada imagen que se ve enfocada en el plano focal corresponde a una célula, se podría estar equivocado y contar un número excesivo de células, si estas tuvieran una forma rara y cortaran el plano en más de una ocasión. Esto se obvia realizando las cuantificaciones en un volumen de referencia delimitado por dos secciones y nunca usando una única sección, o secciones independientes.

El disector es, pues, una sonda de medida que tiene unas dimensiones conocidas, tanto en lo referente a los planos de sección como a la profundidad. Esta sonda estudia una muestra del tejido en cuestión y se puede introducir en el tejido cuantas veces se quiera. Como es fácilmente comprensible no se puede estudiar la totalidad de un tejido, además de que resulta innecesario. Lo más útil es seleccionar una muestra y estudiarla. Pero para que la muestra estudiada sea representativa de la población original se debe seleccionar al azar. Todas las partes del tejido a estudiar deben tener las mismas probabilidades de ser muestreadas por la sonda de medida.

Cada disector engloba un número determinado de partículas de las características que se están estudiando. Teniendo en cuenta los criterios de inclusión y exclusión de partículas, no se deben incluir en el conteo las que aparecen a la vez en el plano de referencia y en el de *observación* (Gundersen, 1986, Jensen y Sundberg, 1986, Cruz-Orive, 1987 a. b.).

2. Cálculo del factor de retracción (FR)

Muchas de las estimaciones estereológicas que se van a realizar en el presente estudio son sensibles a los cambios volumétricos producidos en el curso del procesamiento de los tejidos. Por ello se estimaron dichos cambios, principalmente atribuibles a la fijación,

deshidratación, inclusión en parafina, etc. (Mayhew, 1991; Mayhew y Gundersen, 1996).

Se trata de transformar los volúmenes medidos en el material incluido en parafina a sus estimaciones reales en el tejido cerebral en fresco. El factor de retracción (FR) fue calculado según el procedimiento siguiente:

El protocolo que se especifica a continuación fue efectuado sobre el cerebro de una rata macho, normal, de 30 días de edad y 200 gramos de peso. El animal se sacrificó y se tomó el cerebro que fue pesado inmediatamente. El volumen en fresco (VF) se determinó aplicando la fórmula:

$$VF = \text{peso cerebral} / \text{densidad del tejido cerebral}$$

A continuación, el cerebro fue fijado en paraformaldehído al 10% en PBS pH 7.4, durante 72 hrs. Se realizaron rodajas coronales con un espesor promedio $t = 2$ mm, que fueron deshidratadas e incluidas en parafina. Cada rodaja fue seccionada exhaustivamente a $4\mu\text{m}$. Los cortes se tiñeron con hematoxilina-eosina (HE).

Para estimar el volumen cerebral retraído (VR), se seleccionó el primer corte de cada rodaja y sobre los cortes muestreados se estimó el volumen aplicando el método de Cavalieri (Howard y Reed, 1998,2005):

$$VR = t \cdot a/p \cdot \sum_{i=1}^m P_i$$

Donde:

t = espesor promedio de las rodajas (2 mm)

a/p = área asociada al punto (3 mm^2)

P_i = número de puntos de la retícula que caen sobre el tejido cerebral

m = número de rodajas \equiv número de cortes empleados

La estimación de P_i se realizó utilizando un microscopio Olympus conectado a una videocámara y provisto de una platina motorizada conectada a su vez a un ordenador. El software empleado (Cast-Grid,

Interactive Vision, Silkeborg, Dinamarca) permite la selección de los campos microscópicos previa la introducción de una fracción de muestreo y genera las retículas empleadas para el conteo de P_i .

Una vez obtenido VR, se calculó FR siendo:

$$FR = VF / VR = 1.63$$

3. Cálculo de la proporción peso cerebral / peso corporal

Para calcular la ratio entre los pesos cerebrales y corporales (RP) se efectuó el cociente entre ambas magnitudes:

$$RP = \text{peso cerebral} / \text{peso corporal}$$

4. Volumen del área visual V2L

Se determinó primero el volumen cerebral para todos los grupos de animales estudiados, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen cerebral (cm}^3\text{)} = \text{Peso cerebral (g)} / \rho$$

Donde ρ = densidad del tejido cerebral en $\text{g/cm}^3 = 1.04$; la magnitud de ρ para el tejido cerebral de la rata se tomó de la bibliografía (Gredell y cols., 2004).

Una vez identificada el área visual V2L, según los criterios indicados más arriba (Paxinos y Watson, 1998), su volumen (Volumen V2L) fue obtenido multiplicando el volumen cerebral por la fracción de volumen ocupada por V2L (V_V V2L).

La estimación de V_V V2L fue realizada empleando al menos 3 cortes (por cada animal en cada grupo y edad), seleccionados al azar entre todas las secciones teñidas con HE.

Para ello se contaron los puntos de una retícula superpuesta por el programa Cast-Grid sobre los cortes seleccionados:

$$V_V V2L = \Sigma \text{ puntos sobre V2L} / \Sigma \text{ puntos sobre toda la sección}$$

El Volumen V2L fue expresado en mm³.

5. Estimación del número y densidad de neuronas.

La cuantificación de la cantidad de neuronas en V2L, inmunorreactivas para NeuN, fue realizada aplicando el método del disector óptico (Howard y Reed, 1998, 2005):

Se seleccionaron, por muestreo sistemático con comienzo al azar (Mayhew y Gundersen, 1996), un promedio de 3 cortes de 18 µm de grosor medio, por cada animal en cada grupo y edad. En cada corte seleccionado se muestreó un promedio de 15 campos. Todas las medidas fueron efectuadas utilizando un microscopio Olympus con un objetivo de inmersión en aceite de 100X (apertura numérica = 1.4) a unos aumentos finales de 1200X. El microscopio estaba conectado al sistema Cast-Grid descrito con anterioridad.

El programa genera retículas de disector que se superponen a la imágenes muestreadas y capturadas con la videocámara. El volumen del disector se calculó aplicando:

$$V_{dis} = S_d \bullet H_d$$

Donde: $S_d = 2282 \mu m^2$ (área del disector) y $H_d = 4 \mu m$ (altura del disector o distancia entre los dos planos focales elegidos para determinar el volumen del disector en el corte). H_d fue medido mediante un microcator (Heidenhein, Transreut, Alemania) conectado al desplazamiento Z de la platina del microscopio. El volumen del disector será por tanto, $V_{dis} = 9128 \mu m^3$.

Las neuronas elegibles para el conteo fueron determinadas mediante la convención de Sterio (Sterio, 1984). Se utilizaron los núcleos neuronales como unidad de muestreo. Se descartaron los núcleos que aparecían en el plano focal superior y todos aquellos que, observados a lo largo del rango de H_d , tocaban algún borde de exclusión del disector. Los núcleos incluidos en el conteo se denotan

por Q_D^- . La densidad numérica de neuronas inmunorreactivas para NeuN (número de neuronas por unidad de volumen: N_V neu) fue obtenida aplicando la fórmula:

$$N_V \text{ neu} = \sum Q_D^- / (FR \bullet \sum V_{dis})$$

Donde, FR = factor de retracción y $\sum V_{dis}$ = número total de disectores aplicados en cada corte muestreado. N_V neu se expresó como número de neuronas $\times 10^3 / \text{mm}^3$ del área V2L.

El número absoluto de neuronas (N neu) fue obtenido multiplicando N_V neu por el Volumen V2L, se expresó como número de neuronas $\times 10^6$.

6. Estimación del número y densidad de astrocitos.

El cálculo de la cantidad de células gliales de V2L, inmunorreactivas para GFAP fue realizado aplicando las mismas técnicas y procedimientos que los descritos para las neuronas.

Se obtuvieron así: La densidad numérica de células gliales, N_V glía, expresada como número de astrocitos $\times 10^3 / \text{mm}^3$ del área V2L y el número absoluto de células gliales, N glía, expresado como número de astrocitos $\times 10^6$.

7. Cálculo del volumen neuronal promedio.

Precisemos primero, que la expresión “volumen neuronal” se refiere al volumen del pericarion neuronal. Para estimar el volumen promedio de las neuronas de V2L se siguieron los siguientes pasos:

Estimación de la fracción de volumen de V2L ocupado por las neuronas ($V_V N$). La estimación de $V_V N$ fue efectuada sobre 3 cortes seleccionados al azar sobre todos los cortes teñidos con HE para cada animal en cada grupo y edad. Se utilizó idéntico software que el empleado para el cálculo de V_V V2L, así:

$$V_V N = \sum \text{puntos sobre los pericaria} / \sum \text{puntos sobre V2L}$$

Estimación del volumen neuronal global (ΣVN). Este parámetro se calculó multiplicando $V_V N$ por Volumen V2L (obtenido como se indicó más arriba).

El volumen promedio de una neurona (U_N) fue hallado aplicando la fórmula:

$$U_N = \Sigma VN / N \text{ neu}$$

Donde, $N \text{ neu}$ es el número absoluto de neuronas calculado previamente, U_N se expresa en μm^3 .

En la Tabla 4 se indican a modo de resumen, todas las variables analizadas en el presente estudio:

Tabla 4

Nombre de la variable	Símbolo	Unidades
Ratio entre peso cerebral y peso corporal	RP	--
Volumen cerebral	--	cm^3
Volumen del área visual V2L	Volumen V2L	mm^3
Densidad numérica de neuronas inmunorreactivas para NeuN	$N_V \text{ neu}$	$n^\circ \text{ de neuronas } \times 10^3 / mm^3$
Número absoluto de neuronas inmunorreactivas para NeuN	$N \text{ neu}$	$n^\circ \text{ de neuronas } \times 10^6$
Densidad numérica de astrocitos inmunorreactivos para GFAP	$N_V \text{ glía}$	$n^\circ \text{ de astrocitos } \times 10^3 / mm^3$
Número absoluto de astrocitos inmunorreactivos para GFAP	$N \text{ glía}$	$n^\circ \text{ de astrocitos } \times 10^6$
Volumen promedio neuronal	U_N	μm^3

E. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Se obtuvieron los valores medios \pm SD de todas las variables estudiadas para cada grupo nutricional (N, DN y RA) en cada grupo de edad (≤ 30 días, > 30 días) y subdividiendo a los animales en machos y hembras. Además, en el grupo de realimentadas (RA) se valoraron los valores medios de las variables en los animales realimentados a P0 y a P21 por separado. Con todos estos datos se realizaron los siguientes análisis

a) ANOVA de dos factores para valorar:

- 1) La influencia de los grupos de edad sobre el estado nutricional.
- 2) La influencia del sexo sobre el estado nutricional.

En los cuadros que se muestran a continuación se esquematiza la distribución de los dos factores en cada uno de los ANOVAS indicados.

ANOVA de 2 factores (1)	Edad	
Grupos nutricionales	≤ 30 días	> 30 días
N	+	+
DN	+	+
RA	+	+

ANOVA de 2 factores (2)	Sexo	
Grupos nutricionales	machos	hembras
N	+	+
DN	+	+
RA	+	+

Se analizaron por lo tanto las siguientes fuentes de variación:

- ANOVA de 2 factores (1): Edad, estado nutricional, interacción entre los dos factores
- ANOVA de 2 factores (2): Sexo, estado nutricional, interacción entre los dos factores

Para la comparación de las medias de cada fila se empleó el test de Bonferroni.

- b) ANOVA de un factor para valorar la influencia del estado nutricional sin tener en cuenta ni la edad ni el sexo. Para la comparación de las medias se empleó el test de Student-Newmann-Keuls.
- c) Test de la t de Student para valorar la influencia de la edad y el sexo, por separado y sin tener en cuenta el estado nutricional.

En el grupo de RA se compararon las medias de las variables entre las ratas realimentadas a P0 y P21, mediante el test de la t de Student.

Con el objeto de determinar las variables capaces de clasificar a los animales en los grupos nutricionales considerados (N, DN, RA) se aplicó el método de análisis discriminante, de modo que se probó el poder clasificatorio de un grupo de variables no correlacionadas (independientes). Se excluyeron por tanto aquellas variables que pueden ser consideradas combinación lineal de otras variables, como el volumen neuronal promedio (función del volumen total neuronal y del número de neuronas) o el volumen ocupado por V2L, ya que en la densidad numérica (neuronas o glía por mm^3 de V2L) está incluida la variable de volumen. El conjunto de variables empleadas se especifica en la Tabla 5. En el transcurso del análisis, las variables discriminantes fueron incorporadas según el método de selección paso a paso: en cada etapa, la variable que minimiza la lambda de Wilks (o que maximiza la estadística F asociada) es incorporada a la función

discriminante. El valor de F (distribución estadística F de Snedecor) para introducir la variable fue como mínimo 3.84 y el valor de F para eliminar la variable fue como máximo de 2.71 (Ferrán, 1997). La estadística de la lambda de Wilks explica la tasa de variabilidad total que no es debida a las diferencias entre grupos clasificatorios (N, DN, RA). Una $\lambda = 1$ significa que la media de los valores que toman las funciones discriminantes es la misma para todos los grupos y por lo tanto no existe variabilidad entre los grupos, mientras que $\lambda < 1$ significa que existen diferencias significativas entre los grupos. Por lo tanto la λ de Wilks proporciona una prueba de la hipótesis nula de que las medias de la población son iguales en todos los grupos (Rodríguez y cols., 2007).

Tabla 5

Grupos de edad (≤ 30 días, > 30 días)
Sexo
RP
N _v neu
N _v glía

Variables utilizadas en el análisis discriminante

Las variables incluidas en el análisis, junto con los valores de sus respectivas λ de Wilks, las F correspondientes y la significación fueron expresadas en forma de tabla. Así mismo se expuso en forma de gráfico la agrupación de los casos obtenida por las funciones discriminantes elaboradas por el análisis. Además se incluyó una tabla que expresa el porcentaje de casos correctamente clasificados por las funciones discriminantes en los grupos nutricionales estudiados.

En todos los análisis empleados se fijó el nivel de significación a $p < 0.05$.

Todos los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico SPSS 9.0 (SPSS INC, CHICAGO ILL U.S.A.-1995). Para la elaboración

de las gráficas se empleó el programa Graph-Pad 5.0 (Graph Pad Software S.DIEGO U.S.A. 2005).

F. FOTOGRAFÍA

Las secciones histológicas se han fotografiado utilizando una cámara digital (DXM1200, Nikon) y una platina motorizada (ProScan, Prior, Cambridge, Inglaterra), controlada por el software AnalySIS® 3.1 (Soft Imaging System GMBH, Munster, Alemania). Con el objetivo de 2X, se adquirieron imágenes mediante el módulo MIA (multiple image alignment). Esta función permite obtener imágenes adyacentes de forma que se puede construir un mosaico de todas ellas. Sobre estas imágenes dibujamos con el programa de imagen y dibujo vectorial Canvas VIII, (ACD Systems, 2001, EE.UU).

VI. RESULTADOS

A. RESULTADOS CUALITATIVOS.

1. Morfología de las ratas según su estado nutricional y grupo de edad.

En el grupo de las DN se observa disminución del tamaño corporal, peso y cambios en aspectos cualitativos tales como caída o falta de crecimiento del pelo, así como tendencia a comer poco, disminución de la motilidad, tendencia al sueño y mayor pasividad. Todas estas alteraciones se mantuvieron en el grupo RA, aunque con menos relevancia que en DN.

2. Identificación del Area Visual V2L

En todos los casos y sobre los cortes teñidos con HE se identifica el área visual V2L de acuerdo con lo indicado en Material y Métodos (Fig. 9).

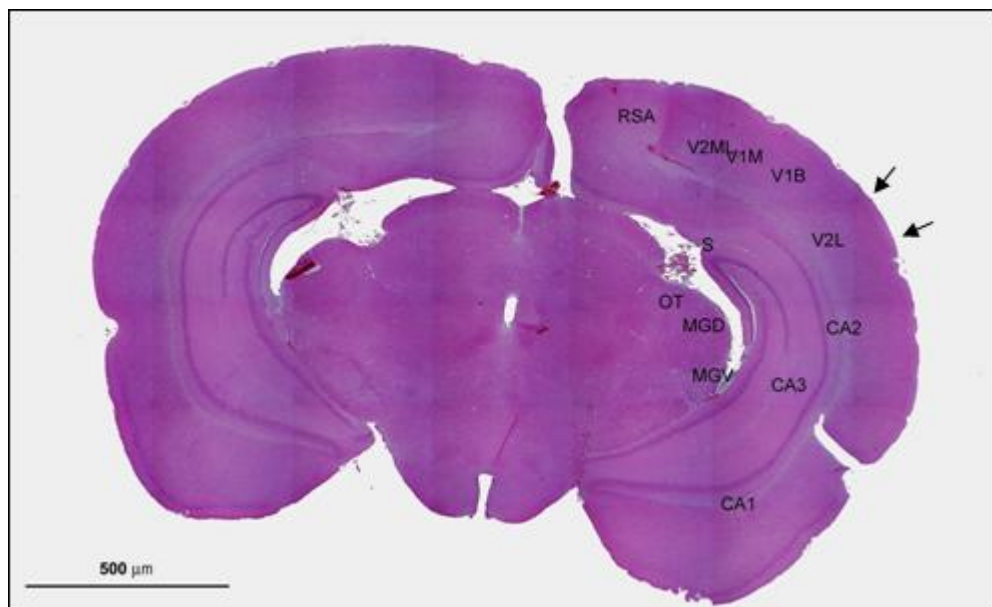


Figura 9. Rata realimentada desde P0, edad P25. Imagen panorámica de una sección teñida con Hematoxilina-Eosina para identificar el área visual V2L (flechas).

3. Descripción histológica

En relación con la histología convencional, no se observan diferencias cualitativas entre los grupos estudiados (Fig. 10 a-c). Sin embargo, en las ratas del grupo DN se puede apreciar cierto incremento de la celularidad glial (Fig. 10 b).

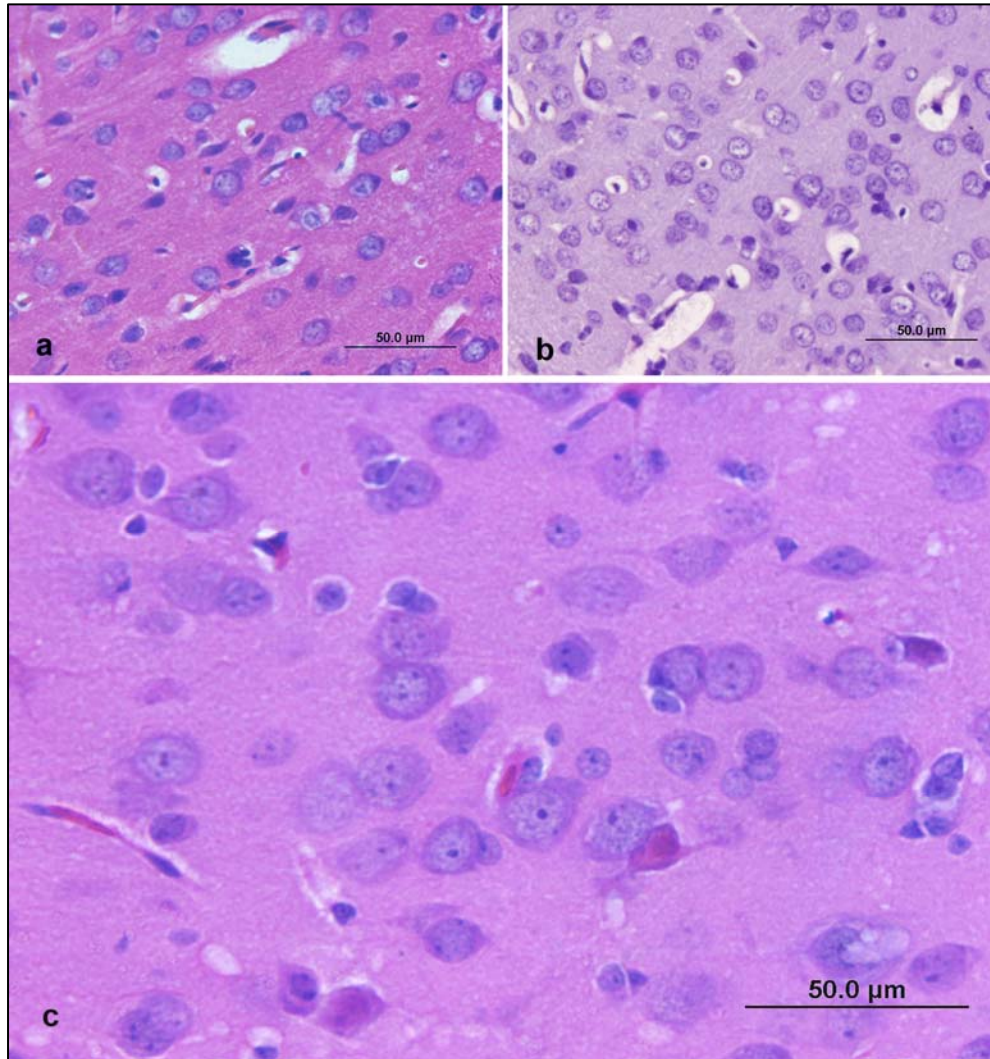


Figura 10. Corteza visual V2L teñida con HE. **a)** Imagen de un animal del grupo N (rata nutrida) edad P42. No se observan alteraciones histológicas. **b)** Imagen de un animal del grupo DN (rata desnutrida) edad P42. No se observan alteraciones histológicas, salvo un discreto incremento de núcleos gliales. **c)** Imagen de un animal del grupo RA (rata realimentada desde P0) edad P25, aspecto similar al observado en el grupo N.

4. Inmunohistoquímica para NeuN

No se aprecian diferencias relevantes entre los casos de ratas del grupo N y los del grupo DN, en relación con la inmunotinción para NeuN, salvo un discreto desplazamiento de la inmunorreactividad del núcleo al citoplasma en el grupo de animales desnutridos (Fig.11 a,b).

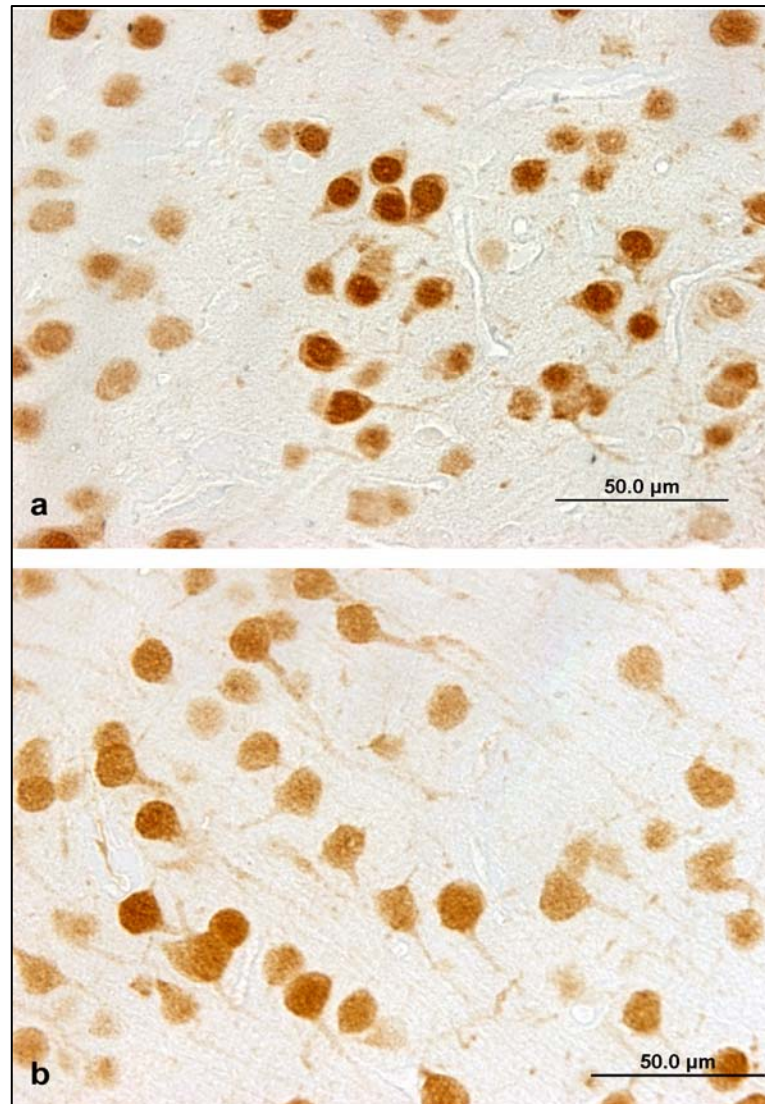


Figura 11. Corteza visual V2L inmunoteñida para NeuN. a) Imagen de un animal del grupo N (rata nutrida) edad P42. Se detecta inmunotinción nuclear predominante. b) Imagen de un animal del grupo DN (rata desnutrida) edad P42. No se observan alteraciones histológicas, salvo una discreta disminución de la intensidad de la inmunotinción nuclear y un incremento de la inmunorreactividad del citoplasma.

En el grupo de animales realimentados (RA), la inmunotinción para NeuN es similar a lo descrito en las ratas nutridas (grupo N), detectándose la inmunotinción preferentemente a nivel nuclear (Fig. 12 a-c).

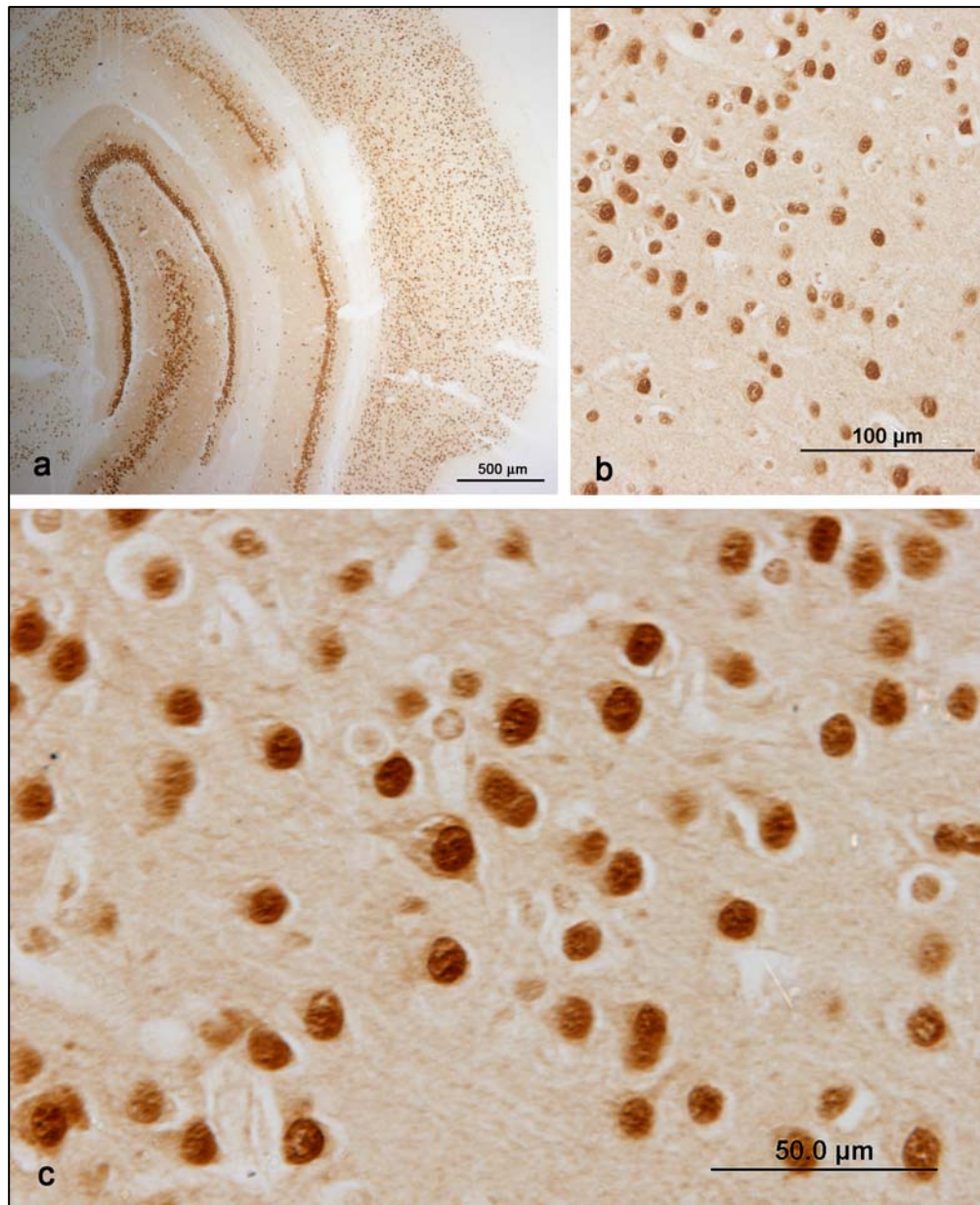


Figura 12. Corteza visual V2L inmunoteñida para NeuN. **a)** Imagen de un animal del grupo RA (rata realimentada desde P0) edad P25. **b)** Mayor detalle de la imagen anterior, se detecta importante inmunotinción neuronal. **c)** Mayor aumento para apreciar la inmunorreactividad nuclear, en todo similar a lo observado en las ratas nutridas.

5. Inmunohistoquímica para GFAP

Las ratas procedentes del grupo N, muestran astrocitos GFAP inmunorreactivos en la corteza V2L (Fig. 13 a). En los animales desnutridos se detecta un cierto incremento de la astrogía inmunoteñida para GFAP (Fig. 13 b).

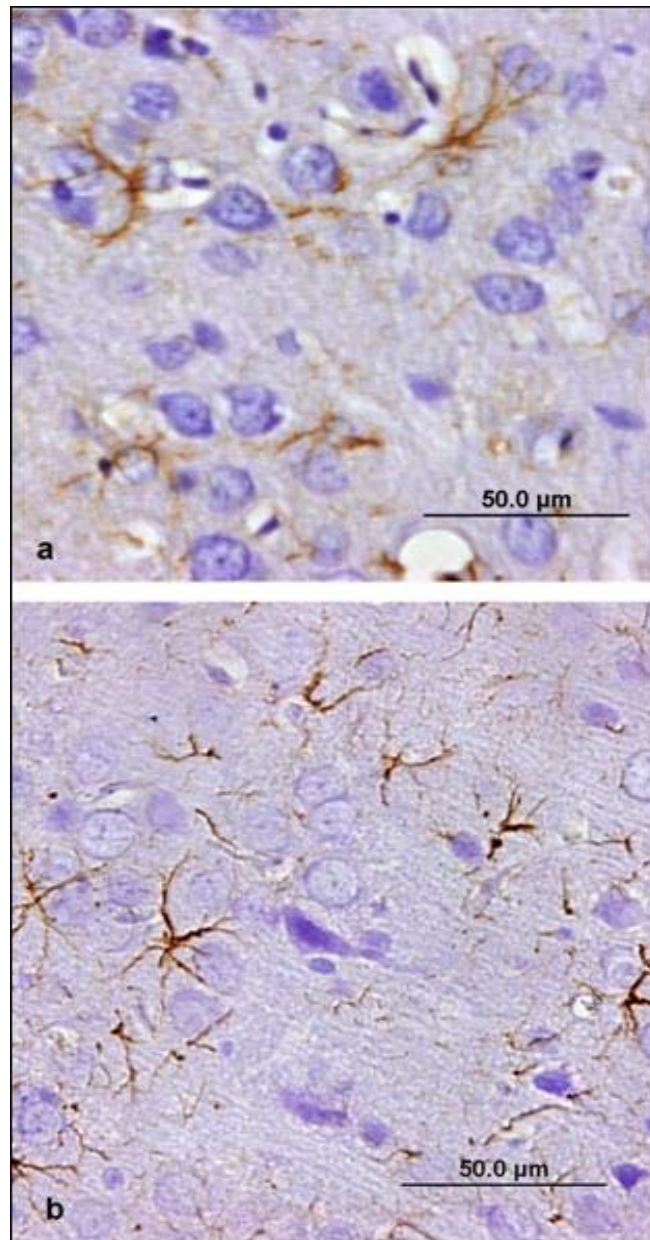


Figura 13. Corteza visual V2L inmunoteñida para GFAP **a)** Imagen de un animal del grupo N (rata nutrida) edad P42. **b)** Imagen de una rata del grupo DN, de la misma edad. Se observa un ligero incremento del número de células inmunorreactivas.

Cuando se compara la inmunorreactividad para GFAP en ratas del grupo N con el grupo de realimentadas no se observan diferencias cualitativas relevantes (Fig. 14 a,b).

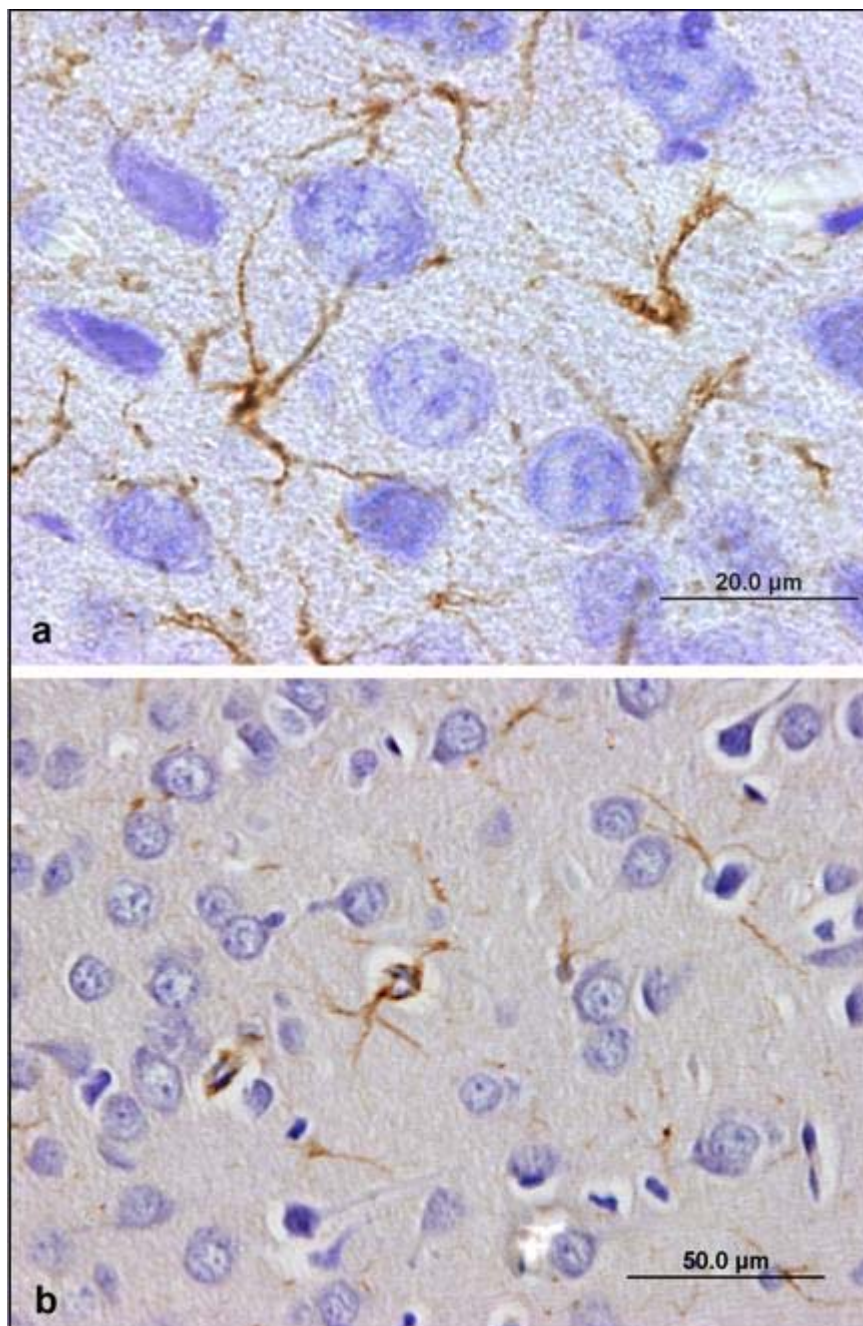


Figura 14. Corteza visual V2L inmunoteñida para GFAP. **a)** Imagen de un animal del grupo N (rata nutrida) edad P42. **b)** Imagen de una rata del grupo RA, realimentada desde P0 a P25.

En todos los grupos se observa abundante glía con evidentes prolongaciones astrocitarias perivasculares inmunoteñidas para GFAP (Fig. 15 a-c).

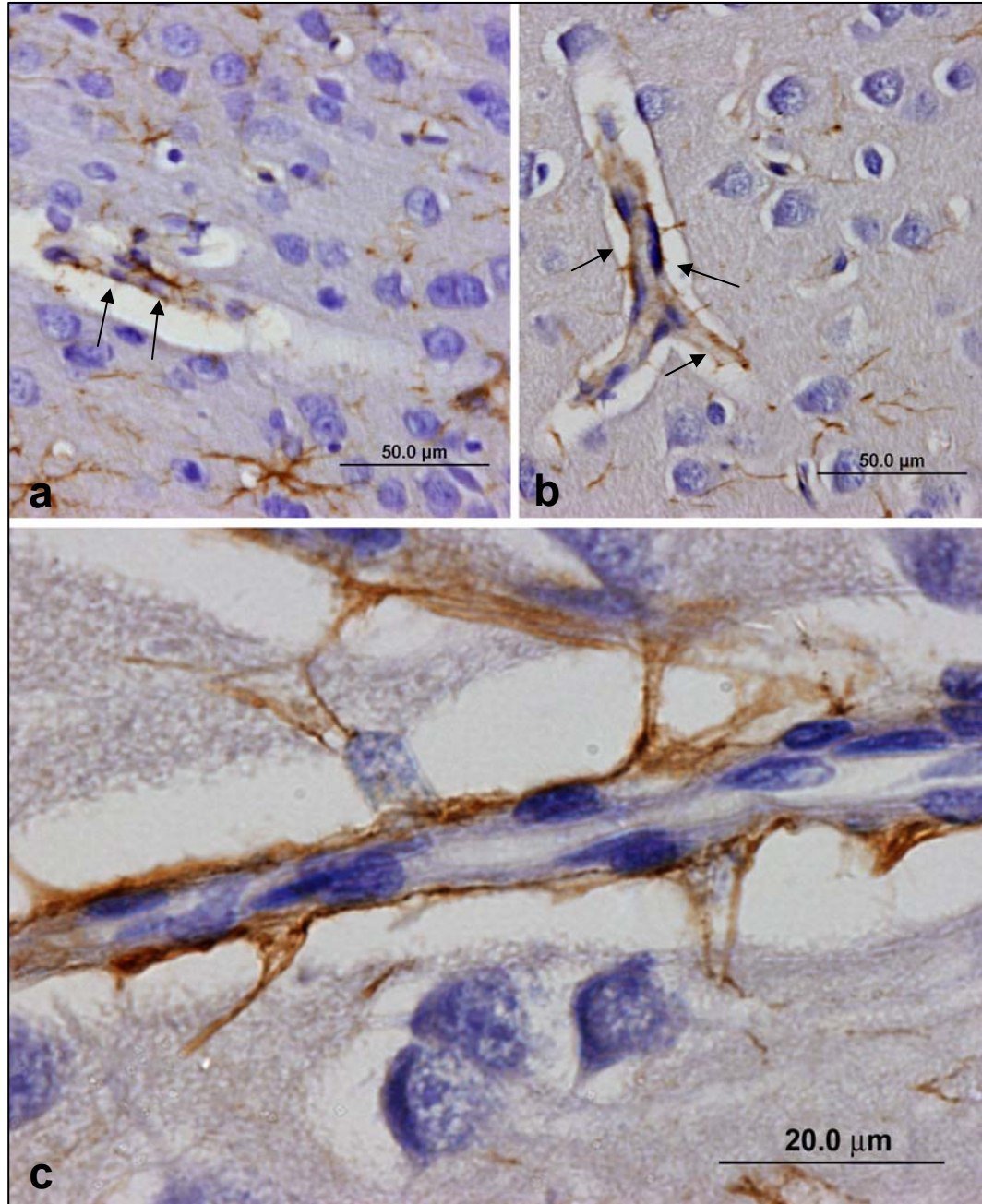


Figura 15. Corteza visual V2L inmunoteñida para GFAP. a) Astrocitos perivasculares (flechas) en un animal del grupo N (rata nutrida) edad P42. b) Imagen de una rata del grupo RA, realimentada desde P0 a P25, también se observan astrocitos perivasculares inmunorreactivos (flechas). c) Mayor detalle de la imagen anterior.

B. RESULTADOS CUANTITATIVOS

1. Relación entre peso corporal y el peso cerebral, según la condición nutricional, la edad y el sexo.

En la Figura 16 Se observa que la RP cambia significativamente en relación con la condición nutricional, de modo que en el grupo de animales desnutridos (DN) la RP muestra un incremento significativo con relación a los grupos N y RA. El grupo de realimentadas (RA) muestra una RP intermedia entre el grupo N y el grupo DN.

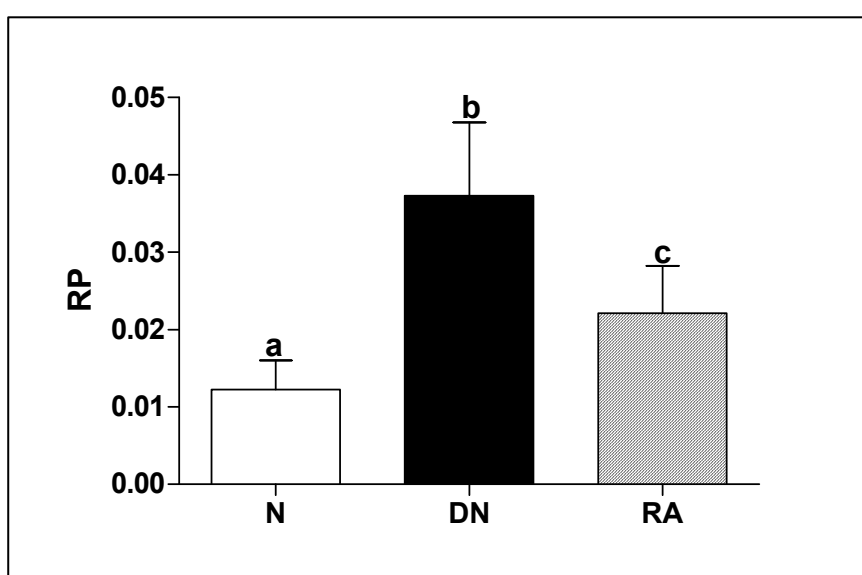


Figura 16. Diagrama de barras que expresa las medias \pm SD de las estimaciones de la proporción entre peso cerebral y peso corporal (RP) para los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas). Las letras colocadas encima de las barras de error muestran la significación. Las barras afectadas por la misma letra no difieren significativamente entre sí, mientras que las afectadas por letras distintas presentan diferencias significativas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 7) muestra que tanto la condición alimentaria como la edad influyen significativamente en los cambios de la RP, con interacción significativa entre ambos factores. Se puede observar (Fig. 17 a) que existen diferencias significativas de

la RP en relación con la edad y la condición alimentaria, exclusivamente para N y DN.

En la Figura 17 b se muestra que el RP de los animales agrupados por la edad, sin tener en cuenta el estado nutricional disminuye significativamente con la edad.

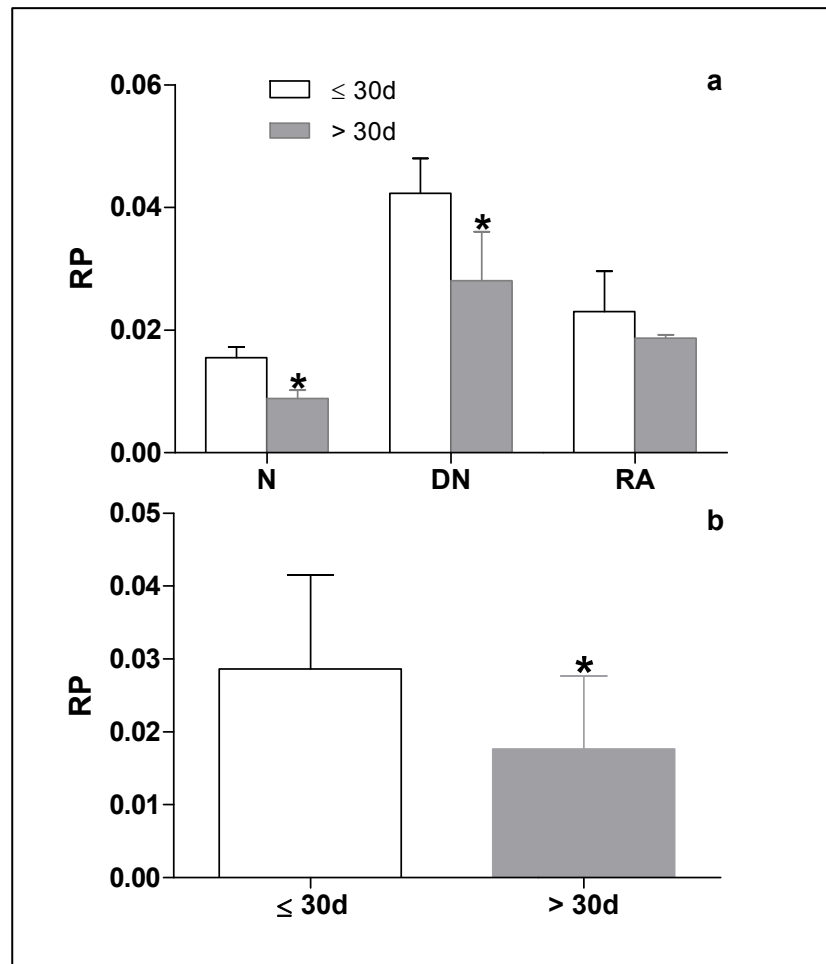


Figura 17. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la proporción entre peso cerebral y peso corporal (RP). (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, los grupos de edad estudiados (≤ 30 días y > 30 días). (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por edades sin tener en cuenta el estado nutricional. Los asteriscos colocados encima de las barras de error indican la presencia de diferencias significativas entre las barras contiguas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 8) muestra que el sexo no influye significativamente en los cambios de la RP, así mismo no se detecta interacción significativa entre estado nutricional y sexo.

Esta ausencia de significación se muestra también en la Figura 18 a, b.

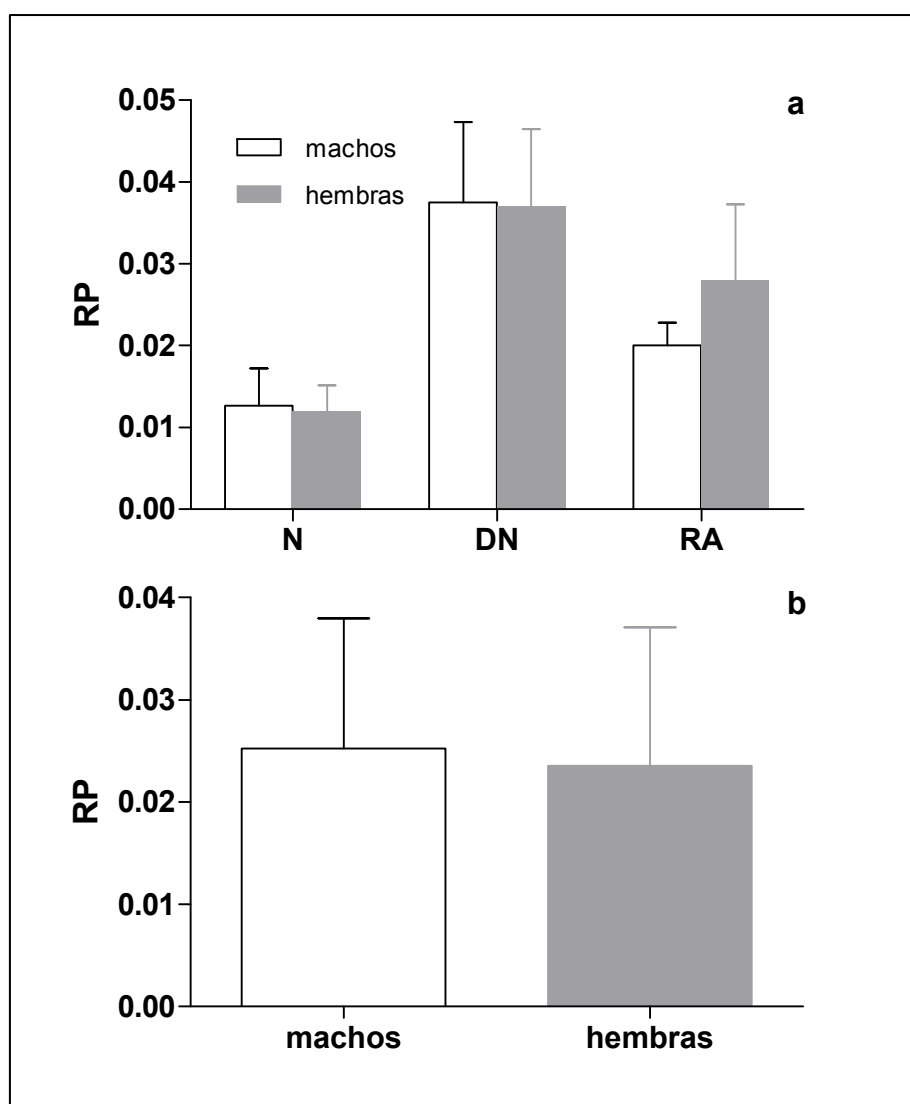


Figura 18. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la proporción entre peso cerebral y peso corporal (RP). (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, el sexo de los animales. (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por sexo sin tener en cuenta el estado nutricional.

2. Estimación de volumen cerebral y volumen del área V2L según la condición nutricional, la edad y el sexo.

En la Figura 19, se observa que el volumen cerebral presenta diferencias significativas entre los tres grupos nutricionales. El mayor valor se da en el grupo de nutridas (N), le sigue el de las realimentadas (RA), y por último las desnutridas (DN).

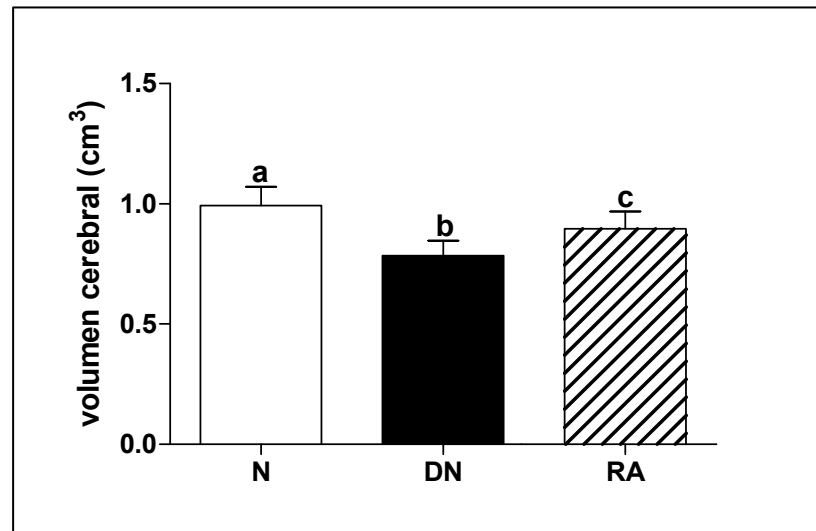


Figura 19. Diagrama de barras que expresa las medias \pm SD de las estimaciones del volumen cerebral en los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas). Las letras colocadas encima de las barras de error muestran la significación. Las barras afectadas por la misma letra no difieren significativamente entre sí, mientras que las afectadas por letras distintas presentan diferencias significativas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 7) muestra que tanto la condición alimentaria como la edad influyen significativamente en los cambios del volumen cerebral, no detectándose interacción significativa entre ambos factores. Se puede observar (Fig. 20 a) que existen diferencias significativas del volumen cerebral en relación con la edad y la condición alimentaria, exclusivamente para N y por debajo de los 30 días postnatales.

En la Figura 20 b se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por edades sin tomar en cuenta el estado nutricional observándose la disminución significativa del volumen cerebral para edades ≤ 30 días.

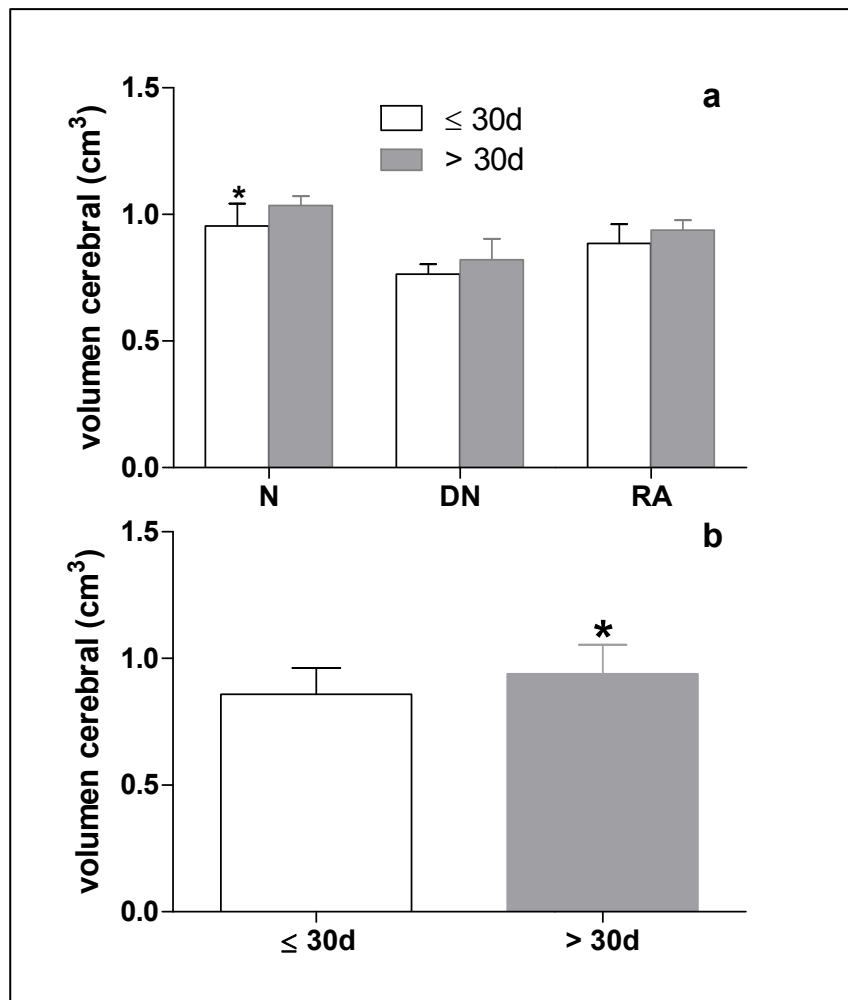


Figura 20. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del volumen cerebral. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, los grupos de edad estudiados (≤ 30 días y > 30 días). (b) Se expresan los resultados de los animales agrupados exclusivamente por edades sin tener en cuenta el estado nutricional. Los asteriscos colocados encima de las barras de error indican la presencia de diferencias significativas entre las barras contiguas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 8) muestra que el sexo aisladamente considerado no influye significativamente en los cambios del volumen cerebral, sin embargo, sí se detecta interacción significativa entre estado nutricional y sexo. En la Figura 21 a se manifiesta que en las hembras del grupo RA el volumen cerebral es significativamente menor que en los machos. La Figura 21 b muestra que cuando se considera exclusivamente el sexo, el volumen cerebral es semejante entre machos y hembras.

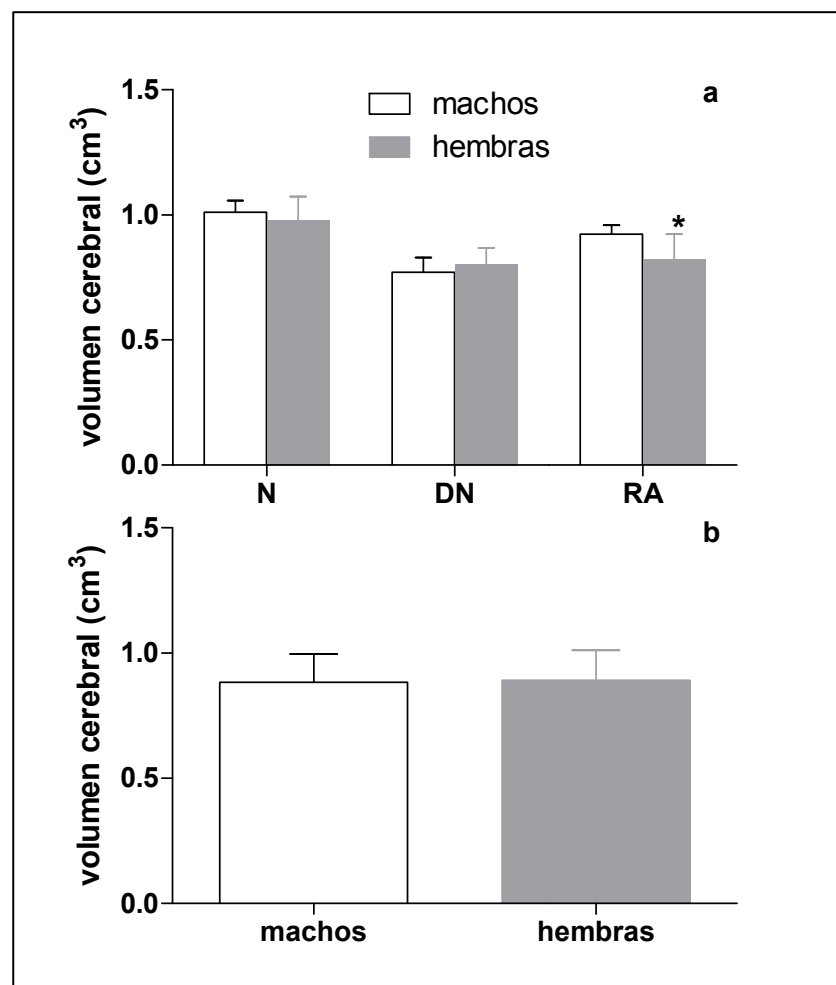


Figura 21. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del volumen cerebral. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, el sexo de los animales. (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por sexo sin tener en cuenta el estado nutricional. El asterisco colocado encima de las barras de error indica la presencia de diferencias significativas entre las barras contiguas.

En la Figura 22, se observa que el volumen V2L disminuye significativamente en DN con respecto a N. El grupo RA presenta un volumen V2L intermedio entre el del grupo N y el DN, pero no muestra diferencias significativas con ambos.

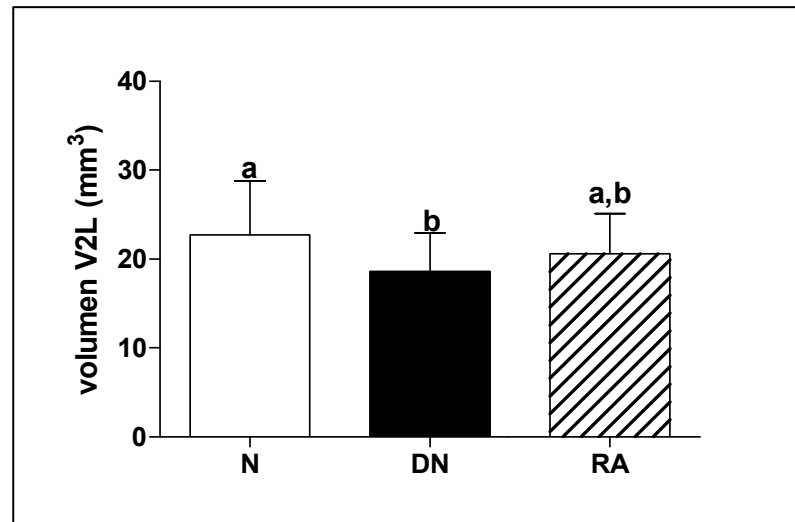


Figura 22. Diagrama de barras que expresa las medias \pm SD de las estimaciones del volumen del área visual V2L en los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas). Las letras colocadas encima de las barras de error muestran la significación. Las barras afectadas por la misma letra no difieren significativamente entre sí, mientras que las afectadas por letras distintas presentan diferencias significativas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 7) muestra que tanto la condición alimentaria como la edad influyen significativamente en los cambios del volumen del área V2L, observándose interacción significativa entre ambos factores. Se puede observar (Fig. 23 a) que existe un incremento significativo de volumen V2L en relación con la edad y la condición alimentaria, exclusivamente para N y por encima de los 30 días postnatales. En la Figura 23 b se detecta ese incremento significativo con la edad cuando no se considera el estado nutricional.

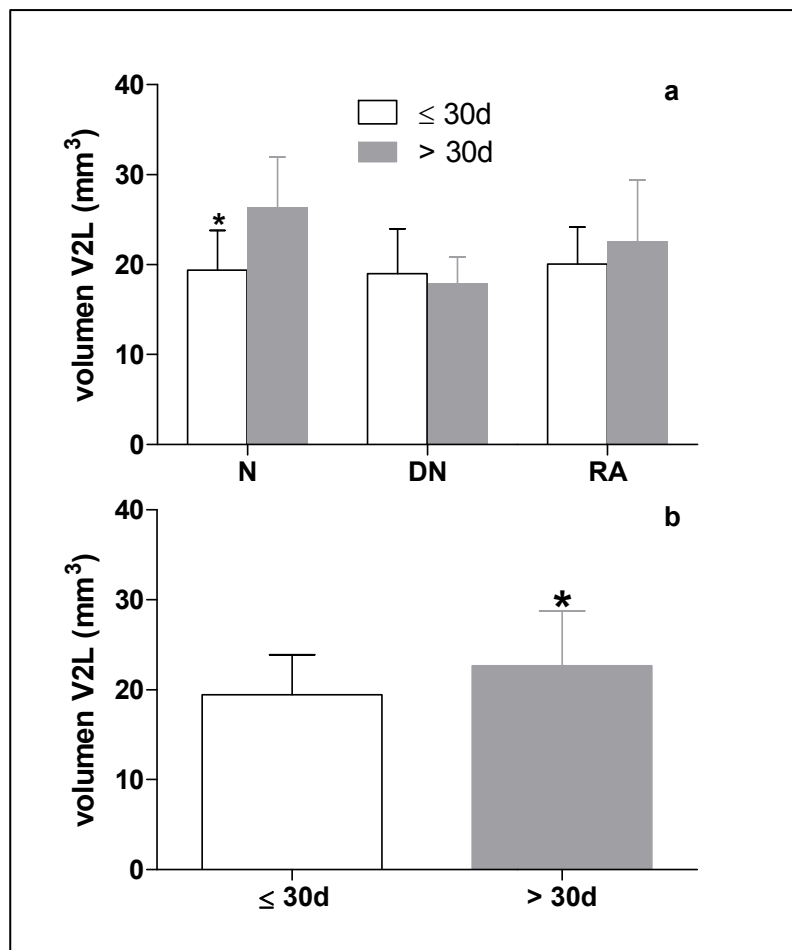


Figura 23. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del volumen del área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, los grupos de edad estudiados (≤ 30 días y > 30 días). (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por edades sin tener en cuenta el estado nutricional. Los asteriscos colocados encima de las barras de error indican la presencia de diferencias significativas entre las barras contiguas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 8) muestra que el sexo no influye significativamente en los cambios de Volumen V2L. En la Figura 24 a,b se observa que Volumen V2L no presenta diferencias significativas para la condición alimentaria cuando se comparan machos y hembras.

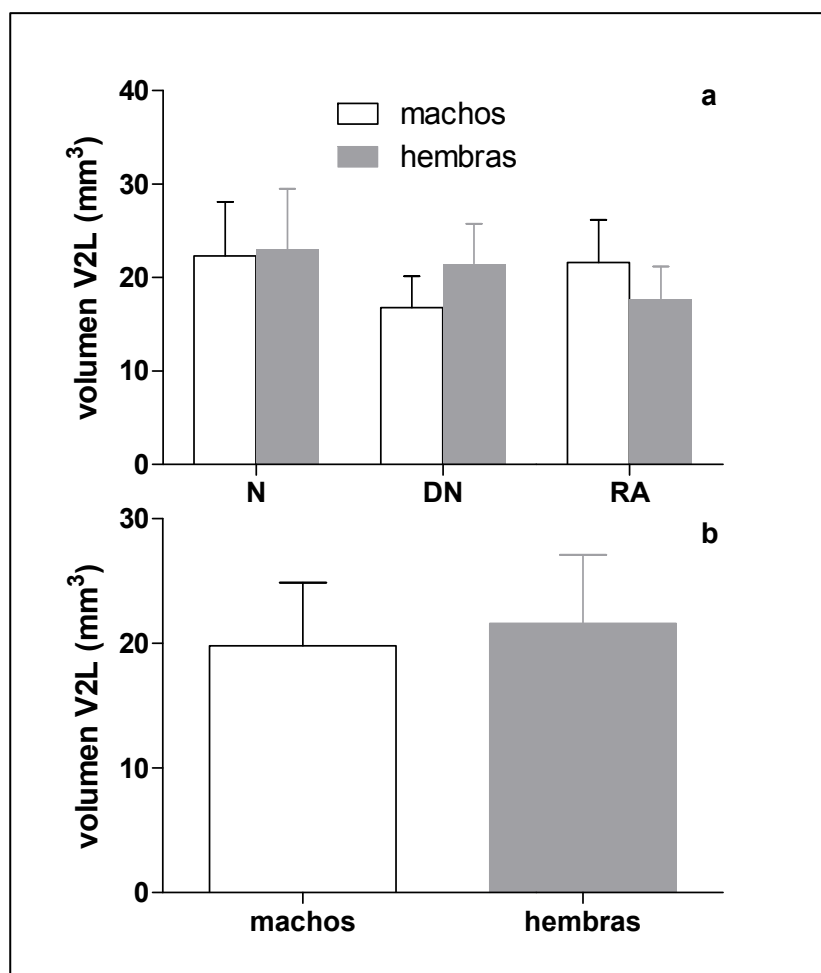


Figura 24. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del volumen del área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, el sexo de los animales. (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por sexo sin tener en cuenta el estado nutricional.

3. Densidad numérica y número absoluto de neuronas según la condición nutricional, la edad y el sexo.

En la Figura 25 se observa que la densidad numérica de neuronas ($N_V \text{ neu}$) es significativamente menor en el grupo N con relación a DN y RA. No hay diferencias significativas entre DN y RA.

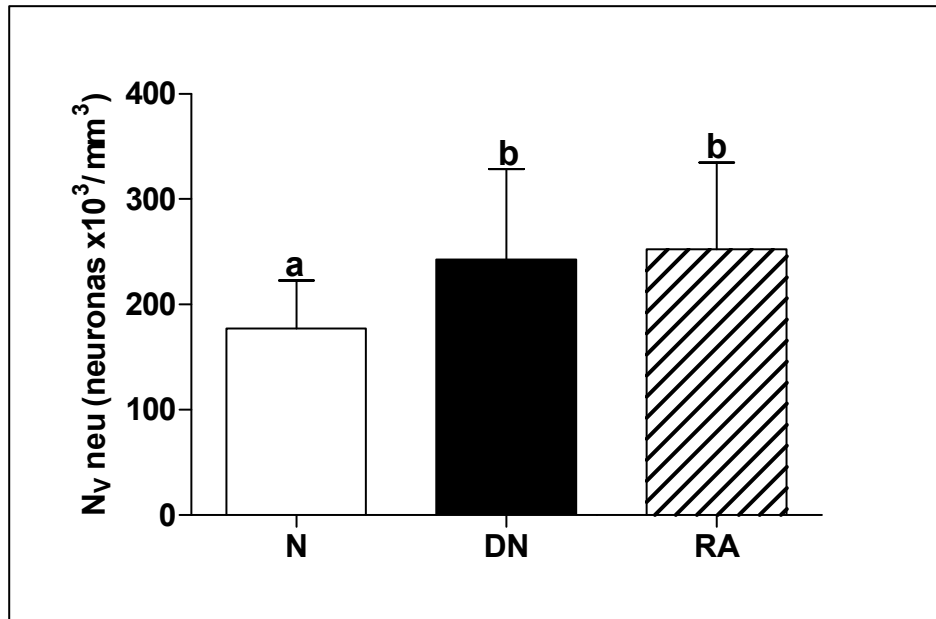


Figura 25. Diagrama de barras que expresa las medias \pm SD de las estimaciones de la densidad numérica neuronal ($N_V \text{ neu}$) en el área V2L en los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas). Las letras colocadas encima de las barras de error muestran la significación. Las barras afectadas por la misma letra no difieren significativamente entre sí, mientras que las afectadas por letras distintas presentan diferencias significativas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 7) muestra que la condición alimentaria pero no la edad, influye significativamente en los cambios de N_V neu, dándose interacción significativa entre ambos factores. En la Figura 26 a, se observa que N_V neu no presenta diferencias significativas para la condición alimentaria cuando se comparan los dos grupos de edad. Cuando se consideran los grupos de edad sin tener en cuenta el estado nutricional, tampoco se observan diferencias significativas (Fig. 26 b).

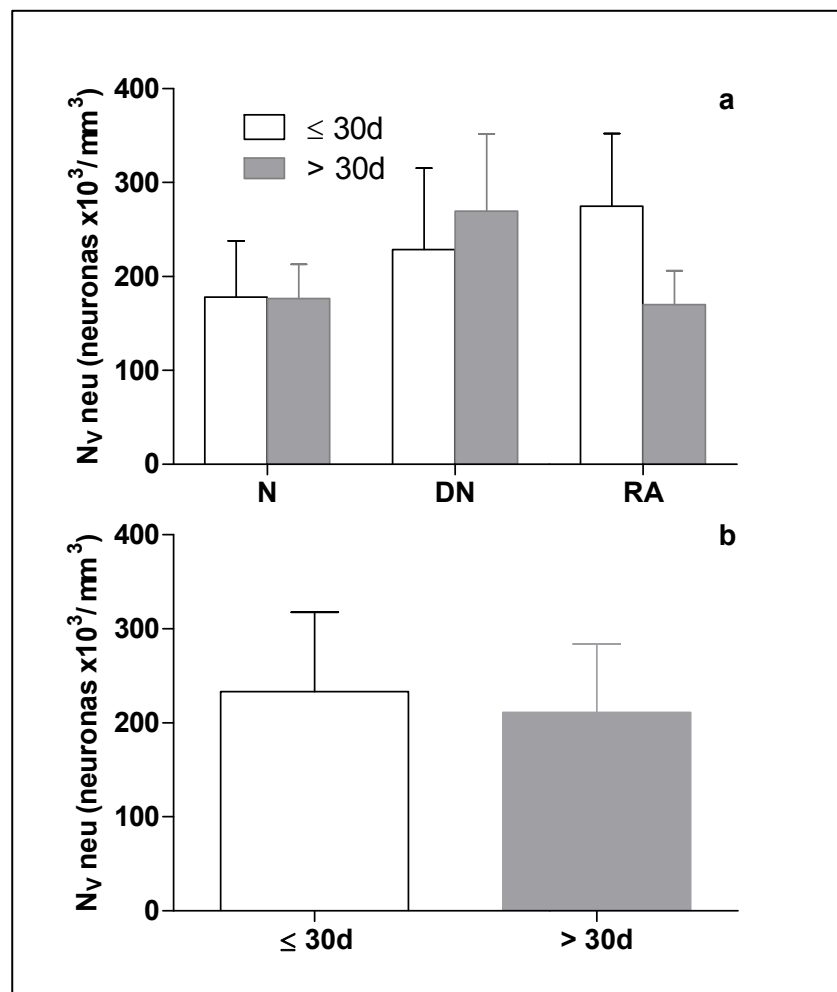


Figura 26. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la densidad numérica neuronal (N_V neu) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, los grupos de edad estudiados (≤ 30 días y > 30 días). (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por edades sin tener en cuenta el estado nutricional.

El ANOVA de dos factores (Tabla 8) muestra que el sexo no influye significativamente en los cambios de N_V neu. Así mismo, en la Figura 27 a,b se observa que la densidad numérica neuronal no presenta diferencias significativas para la condición alimentaria cuando se comparan machos y hembras.

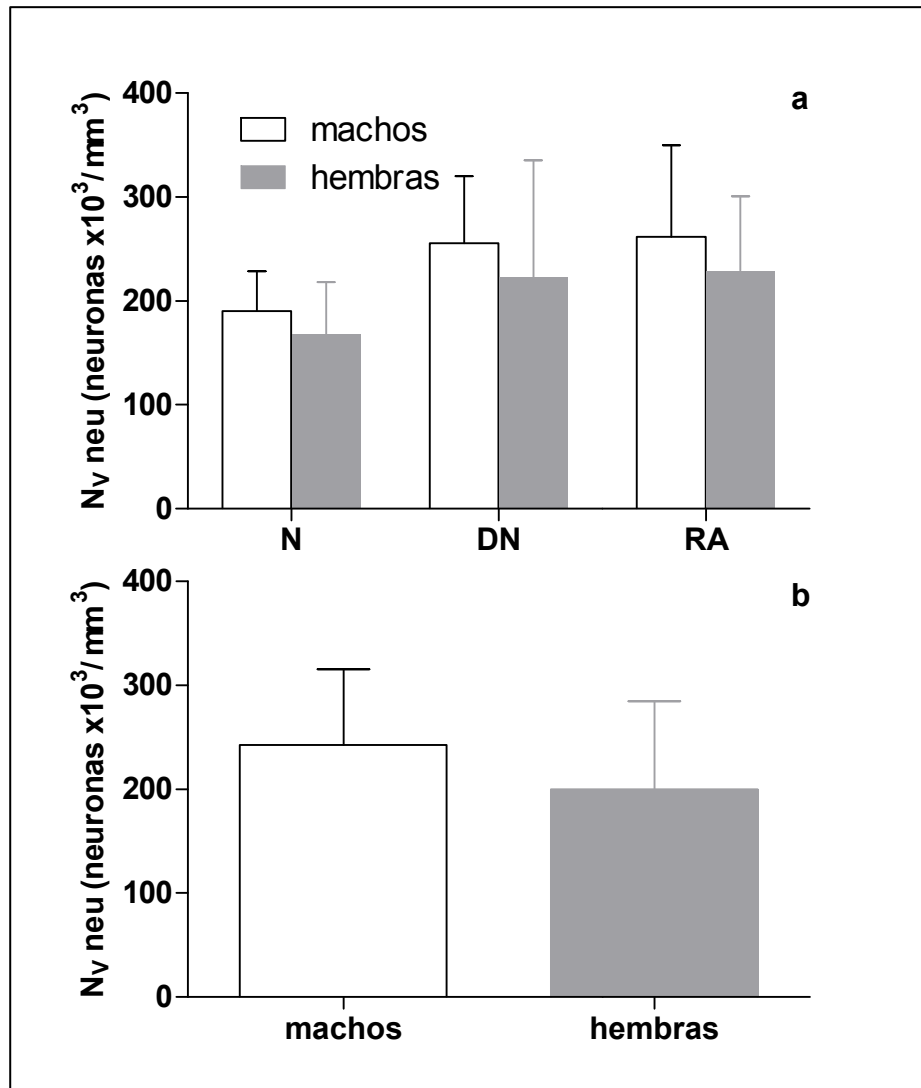


Figura 27. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la densidad numérica neuronal (N_V neu) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, el sexo de los animales. (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por sexo sin tener en cuenta el estado nutricional.

El número absoluto de neuronas (N neu) no cambia significativamente en relación con el estado nutricional (Fig. 28).

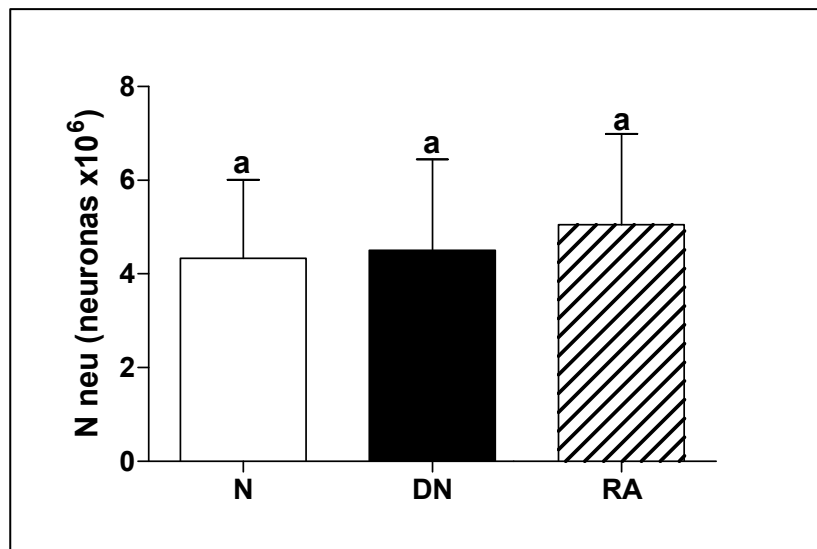


Figura 28. Diagrama de barras que expresa las medias \pm SD de las estimaciones del número absoluto de neuronas (N neu) en el área V2L en los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas). Las letras colocadas encima de las barras de error muestran la significación. Las barras afectadas por la misma letra no difieren significativamente entre sí, mientras que las afectadas por letras distintas presentan diferencias significativas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 7) muestra que ni la condición alimentaria ni la edad influyen significativamente en los cambios de N neu, no detectándose interacción significativa entre ambos factores. En la Figura 29 a, se observa que N neu no presenta diferencias significativas para la condición alimentaria cuando se comparan los dos grupos de edad. Cuando se consideran los grupos de edad sin tener en cuenta el estado nutricional, tampoco se observan diferencias significativas (Fig. 29 b).

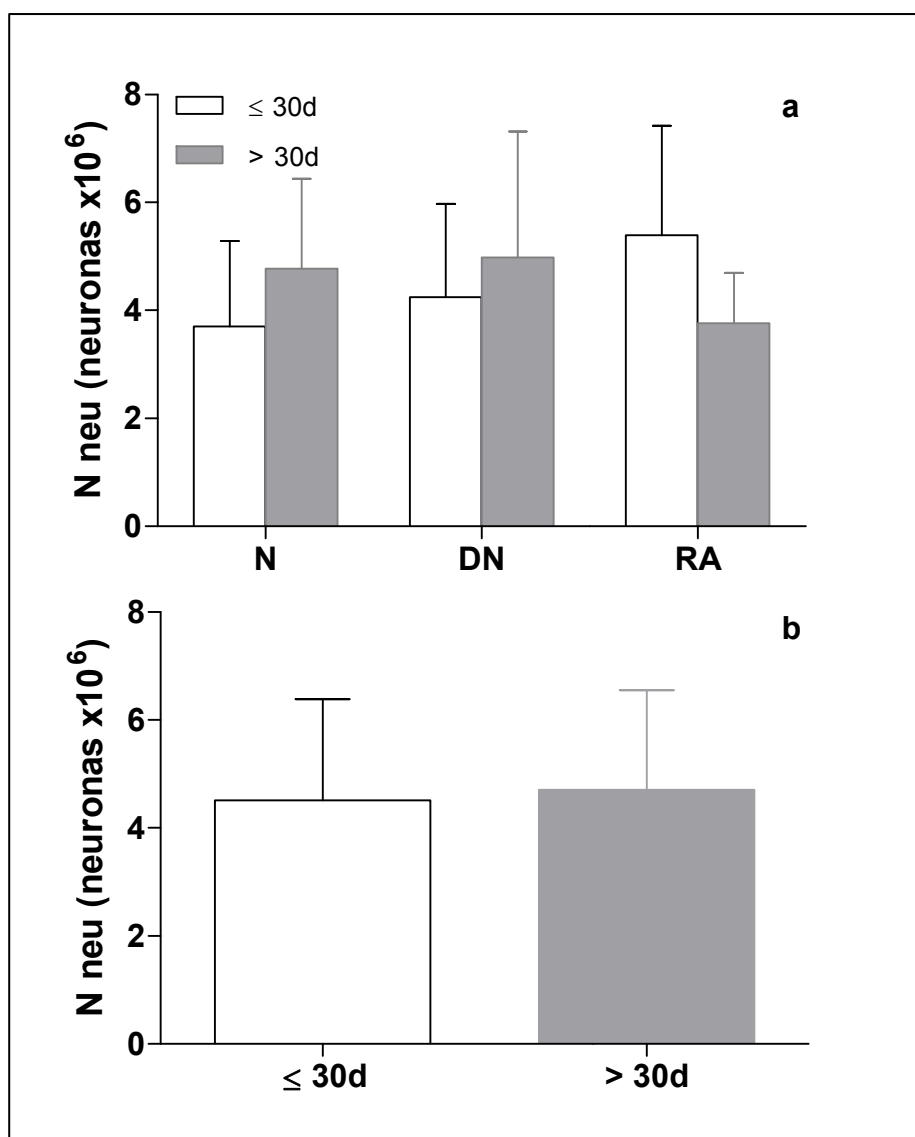


Figura 29. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la número absoluto de neuronas(N neu) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, los grupos de edad estudiados (≤ 30 días y > 30 días). (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por edades sin tener en cuenta el estado nutricional.

El ANOVA de dos factores (Tabla 8) muestra que el sexo no influye significativamente en los cambios de N neu. Así mismo, en la Figura 30 a,b se observa que el número absoluto de neuronas no presenta diferencias significativas para la condición alimentaria cuando se comparan machos y hembras.

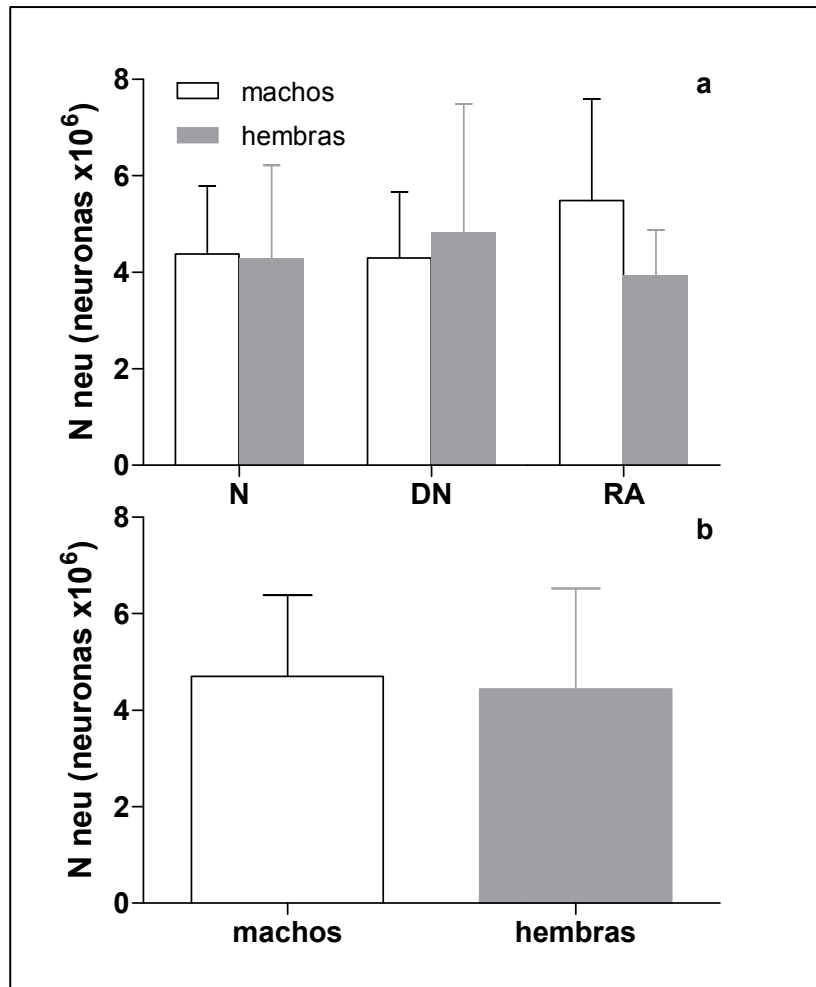


Figura 30. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del número absoluto de neuronas (N neu) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, el sexo de los animales. (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por sexo sin tener en cuenta el estado nutricional.

4. Diferencias de la densidad numérica y el conteaje absoluto de astrocitos según la condición nutricional, la edad y el sexo.

Se observa que la densidad numérica de astrocitos (N_V glía) no cambia significativamente en relación con el estado nutricional (Fig. 31).

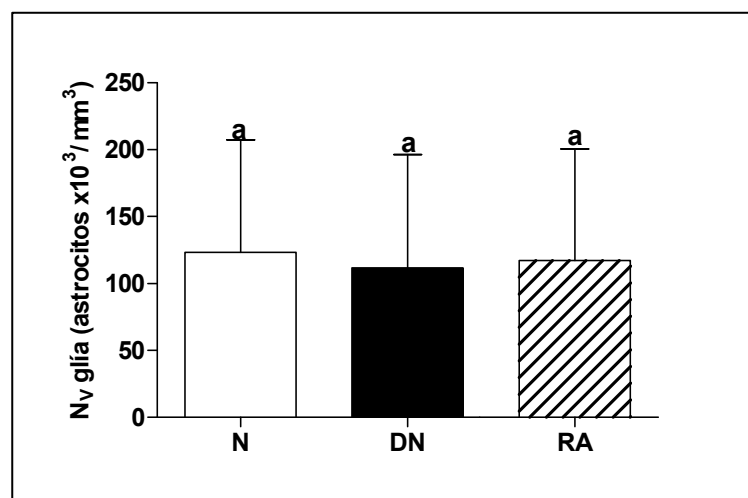


Figura 31. Diagrama de barras que expresa las medias \pm SD de las estimaciones de la densidad numérica astrocitaria (N_V glía) en el área V2L en los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas). Las letras colocadas encima de las barras de error muestran la significación. Las barras afectadas por la misma letra no difieren significativamente entre sí, mientras que las afectadas por letras distintas presentan diferencias significativas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 7) muestra que la condición alimentaria no influye significativamente en los cambios de N_V glía, sin embargo sí se detecta que la edad influye significativamente sobre esa variable, no observándose interacción significativa entre ambos factores. En la Figura 32 a, se manifiesta que para >30 días, el grupo de ratas nutridas (N) presenta un incremento significativo de la densidad astrocitaria. Ese incremento también se detecta cuando se

consideran los grupos de edad sin tener en cuenta la situación nutricional (Fig. 32 b),

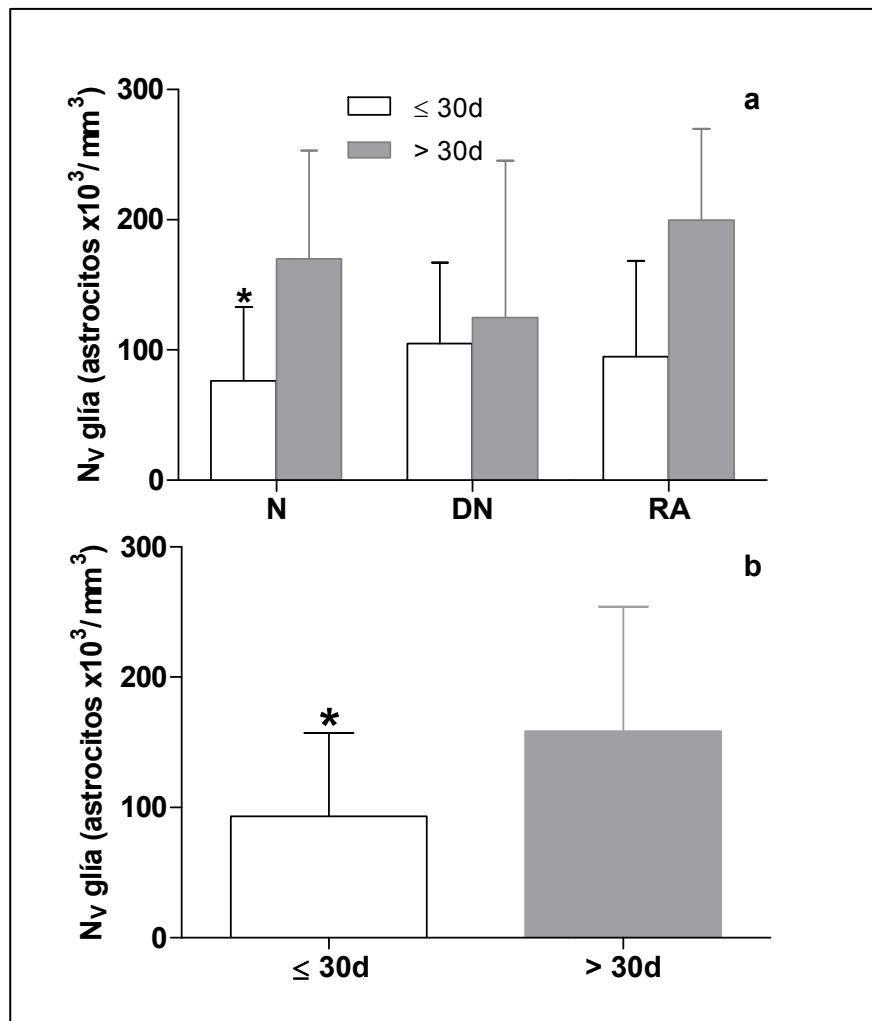


Figura 32. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la densidad numérica astrocitaria (N_v glía) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, los grupos de edad estudiados (≤ 30 días y > 30 días). (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por edades sin tener en cuenta el estado nutricional. Los asteriscos colocados encima de las barras de error indican la presencia de diferencias significativas entre las barras contiguas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 8) muestra que el sexo no influye significativamente en los cambios de N_v glía. Así mismo, en la Figura 33 a,b se observa que la densidad astrocitaria no presenta

diferencias significativas para la condición alimentaria cuando se comparan machos y hembras.

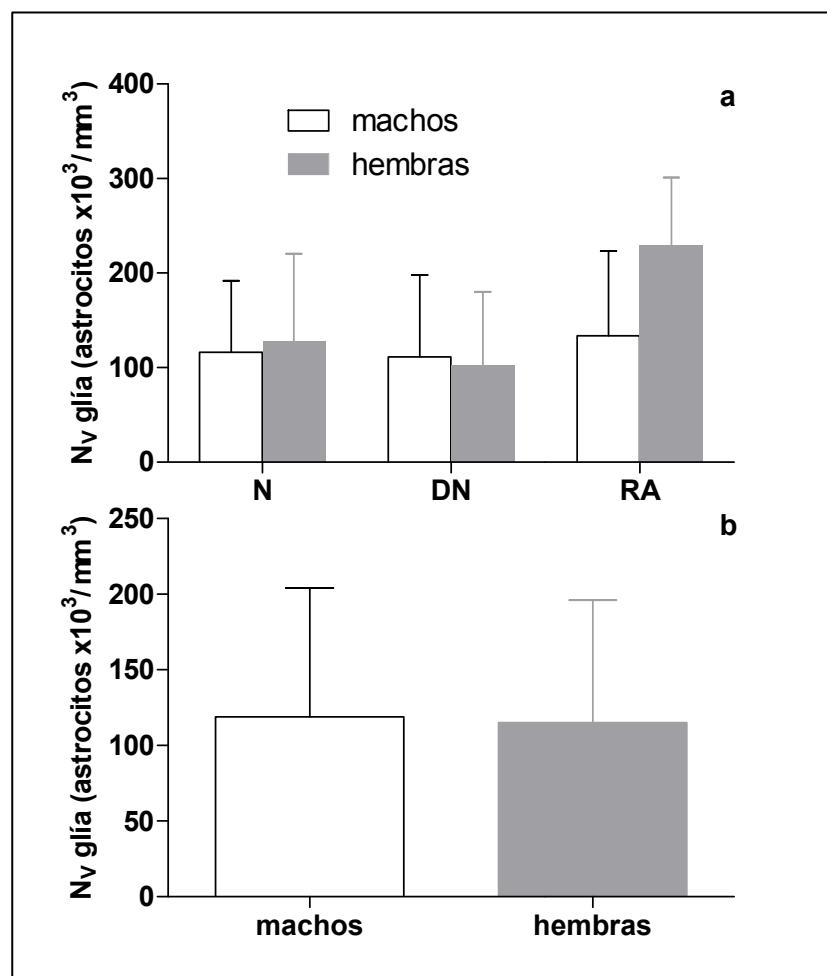


Figura 33. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la densidad numérica astrocitaria ($N_v \text{ glía}$) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, el sexo de los animales. (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por sexo sin tener en cuenta el estado nutricional.

Se observa que el número absoluto de astrocitos (N glía) no cambia significativamente en relación con el estado nutricional (Fig. 34).

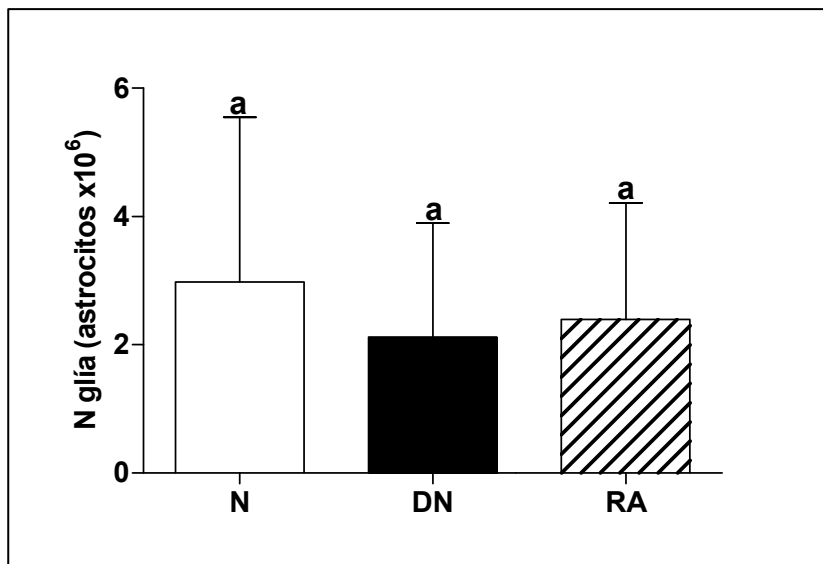


Figura 34. Diagrama de barras que expresa las medias \pm SD de las estimaciones del número absoluto de astrocitos (N glía) en el área V2L en los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas). Las letras colocadas encima de las barras de error muestran la significación. Las barras afectadas por la misma letra no difieren significativamente entre sí, mientras que las afectadas por letras distintas presentan diferencias significativas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 7) muestra que la condición alimentaria no influye significativamente en los cambios de N glía, sin embargo sí se detecta que la edad influye significativamente sobre esa variable, no evidenciándose interacción significativa entre ambos factores. En la Figura 35 a, se manifiesta que para >30 días, el grupo de ratas nutridas (N) presenta un incremento significativo del número absoluto de astrocitos. Ese incremento también se detecta cuando se consideran los grupos de edad sin tener en cuenta la situación nutricional (Fig. 35 b).

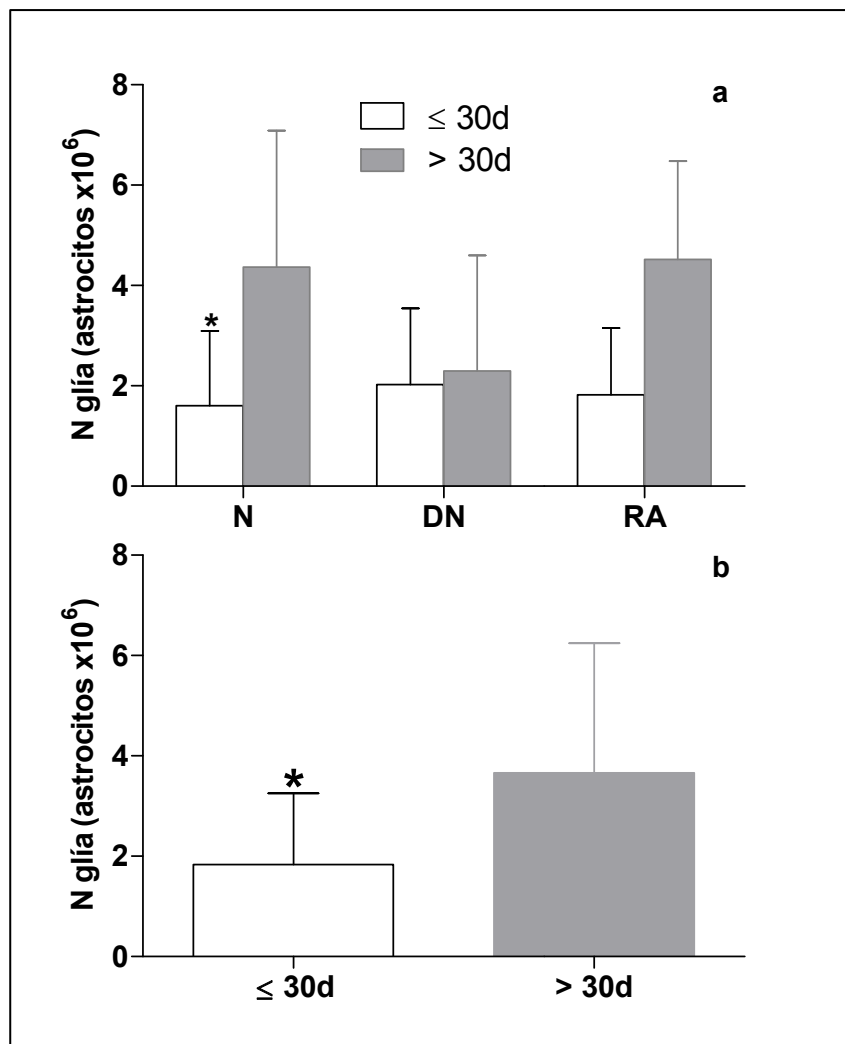


Figura 35. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del número absoluto de astrocitos (N glía) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, los grupos de edad estudiados (≤ 30 días y > 30 días). (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por edades sin tener en cuenta el estado nutricional. Los asteriscos colocados encima de las barras de error indican la presencia de diferencias significativas entre las barras contiguas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 8) muestra que el sexo no influye significativamente en los cambios de N glía. Así mismo, en la Figura 36 a,b se observa que el número de astrocitos no presenta

diferencias significativas para la condición alimentaria cuando se comparan machos y hembras.

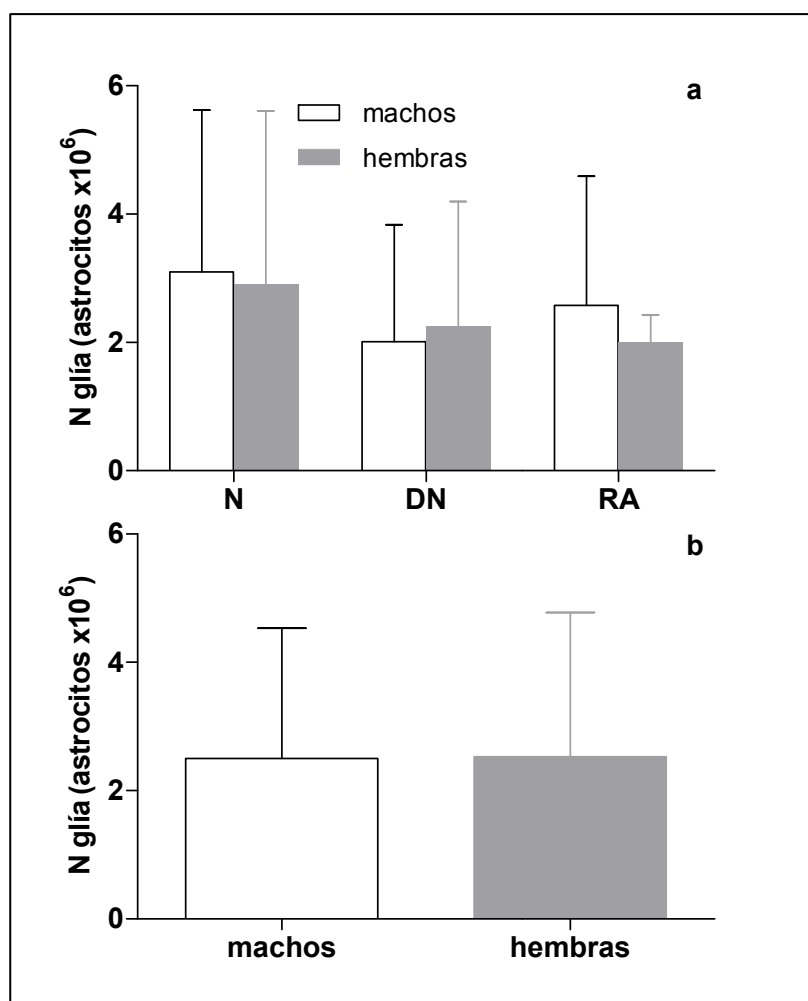


Figura 36. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del número absoluto de astrocitos (N glía) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, el sexo de los animales. (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por sexo sin tener en cuenta el estado nutricional.

5. Diferencias del volumen promedio neuronal según la condición nutricional, la edad y el sexo.

Se observa que el volumen promedio neuronal no cambia significativamente en relación con el estado nutricional (Fig. 37).

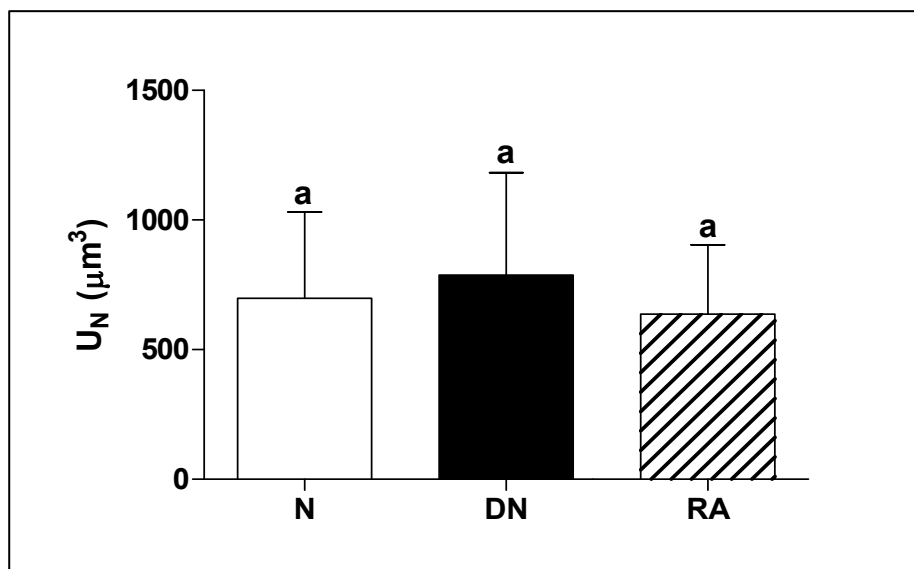


Figura 37. Diagrama de barras que expresa las medias \pm SD de las estimaciones del volumen promedio neuronal (U_N) en el área V2L en los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas). Las letras colocadas encima de las barras de error muestran la significación. Las barras afectadas por la misma letra no difieren significativamente entre sí, mientras que las afectadas por letras distintas presentan diferencias significativas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 7) muestra que la edad, pero no la condición alimentaria, influye significativamente en los cambios de U_N , no se observa interacción significativa entre ambos factores. En la Figura 38 a, se manifiesta que no existen diferencias significativas para el volumen promedio neuronal, considerando conjuntamente la edad y el estado nutricional. Sin embargo, si se detecta una disminución significativa de U_N para el grupo de edad > 30 días, cuando no se considera la situación nutricional (Fig. 38 b).

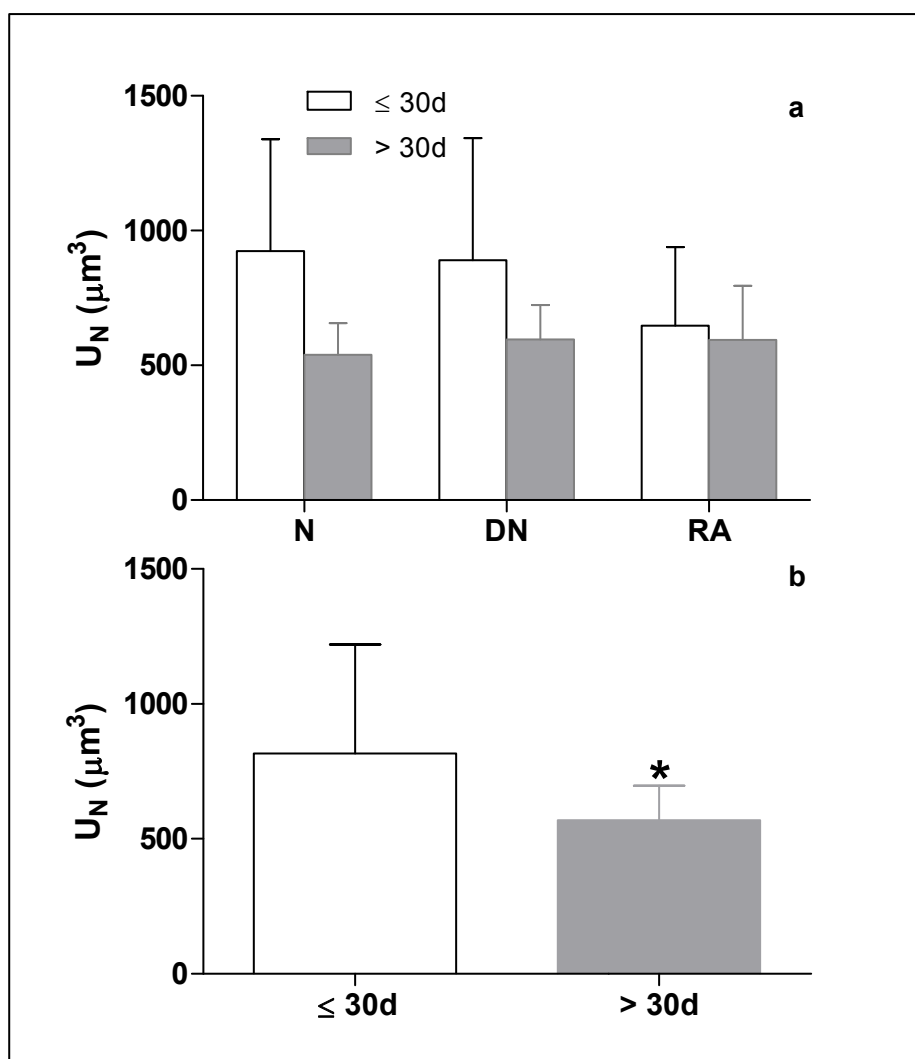


Figura 38. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del volumen promedio neuronal (U_N) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, los grupos de edad estudiados (≤ 30 días y > 30 días). (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por edades sin tener en cuenta el estado nutricional. El asterisco colocado encima de las barras de error indican la presencia de diferencias significativas entre las barras contiguas.

El ANOVA de dos factores (Tabla 8) muestra que el sexo no influye significativamente en los cambios de U_N . Así mismo, en la Figura 39 a,b se observa que el volumen promedio neuronal no presenta diferencias significativas para la condición alimentaria cuando se comparan machos y hembras.

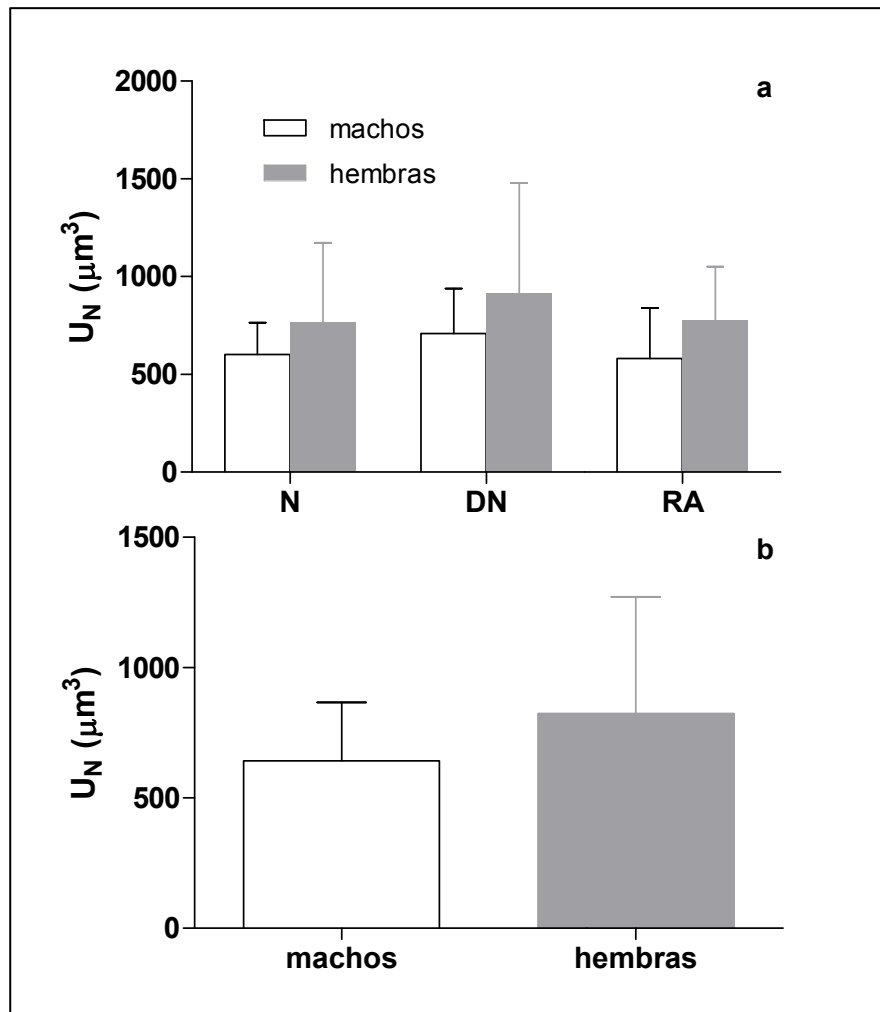


Figura 39. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del volumen promedio neuronal (U_N) en el área visual V2L. (a) Se muestran los distintos grupos nutricionales: N (ratas nutridas), DN (ratas desnutridas), RA (ratas realimentadas), considerando para cada uno, el sexo de los animales. (b) Se muestran los resultados de los animales agrupados exclusivamente por sexo sin tener en cuenta el estado nutricional.

6. Diferencia de la ratio de pesos cerebrales y corporales, densidad numérica y número absoluto de neuronas y astrocitos y volumen promedio neuronal en ratas realimentadas desde P0 o P21.

En la Figura 40 se observa que la RP no cambia en relación con el momento de comienzo de la realimentación, no detectándose diferencias significativas entre P0 y P21.

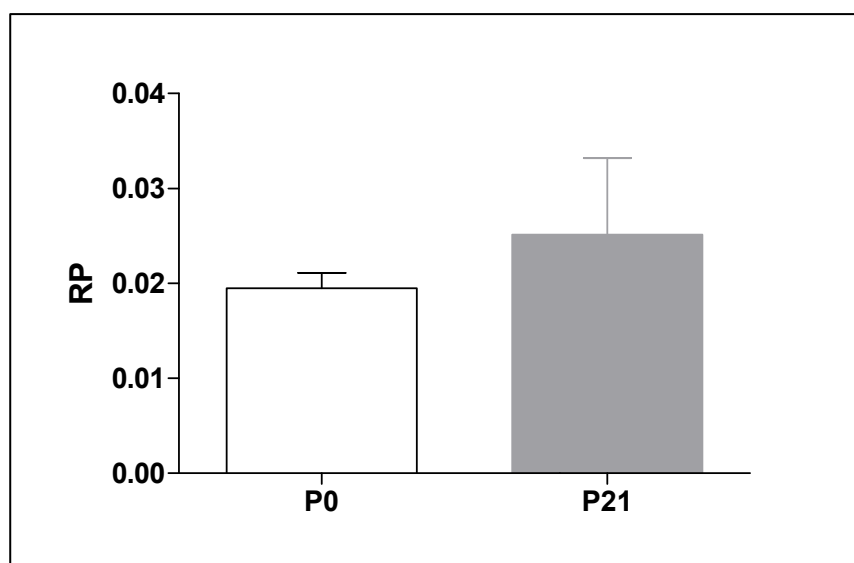


Figura 40. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la proporción entre peso cerebral y peso corporal (RP) en ratas realimentadas en P0 y en P21.

En la Figura 41 a, se observa que el volumen cerebral no cambia en relación con el momento de comienzo de la realimentación, no detectándose diferencias significativas entre P0 y P21. Algo análogo se observa en la Figura 41 b, con referencia al volumen del área visual V2L.

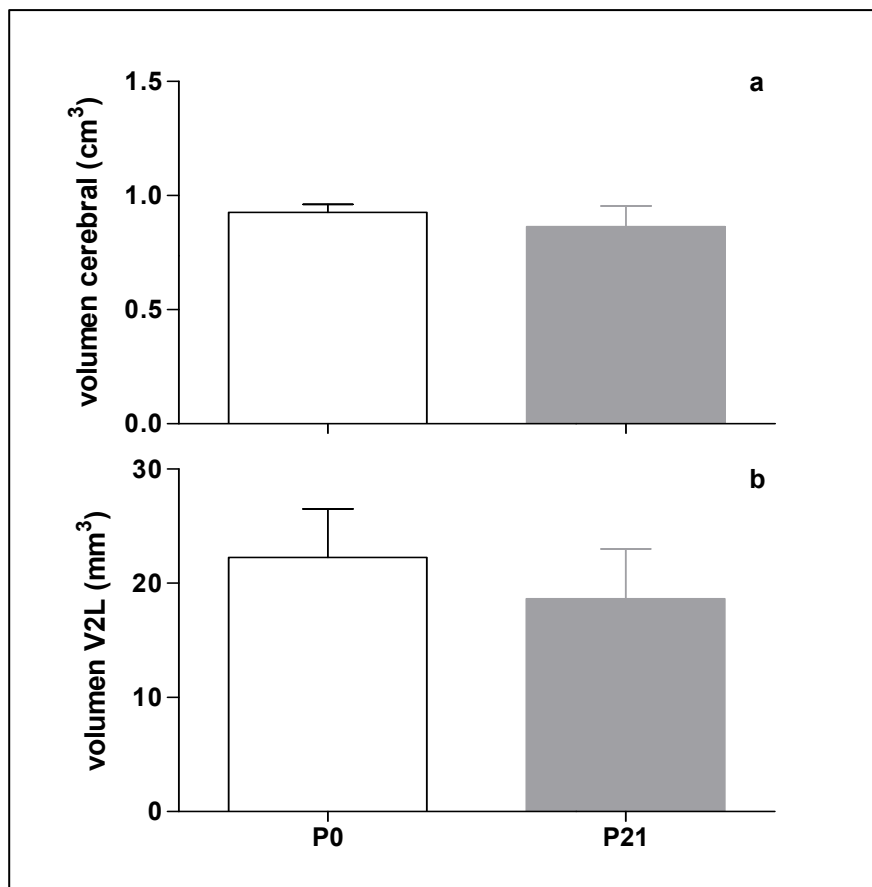


Figura 41. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del volumen cerebral (a) y del volumen del área visual V2L (b) en ratas realimentadas en P0 y en P21.

En la Figura 42 a, se observa que la densidad numérica neuronal es significativamente menor en las ratas realimentadas a P0 que en los animales realimentados a P21. Sin embargo el número absoluto de neuronas (Fig. 42 b) no varía significativamente en relación con el comienzo de la realimentación

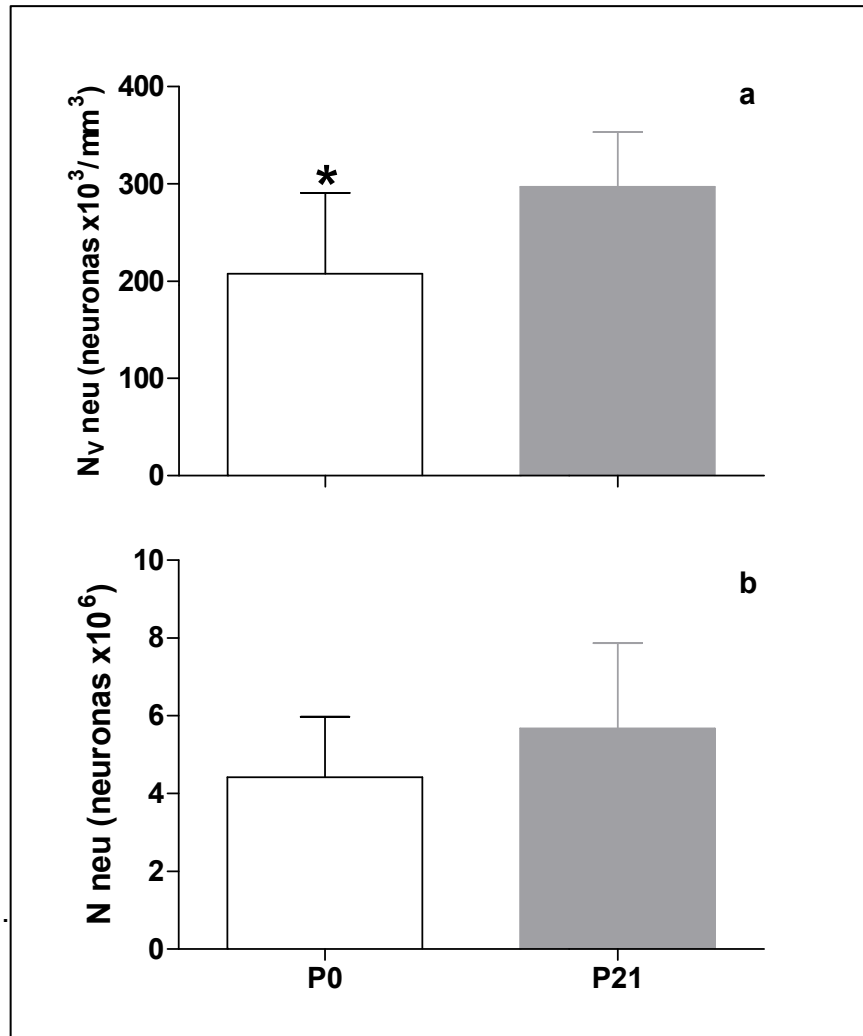


Figura 42. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la densidad numérica neuronal ($N_v \text{ neu}$) (a) y del número absoluto de neuronas ($N \text{ neu}$) (b) en ratas realimentadas en P0 y en P21. El asterisco colocado encima de las barras de error indica la presencia de diferencias significativas entre las barras contiguas.

En la Figura 43 a, se observa que la densidad numérica de astrocitos no cambia en relación con el momento de comienzo de la realimentación, no detectándose diferencias significativas entre P0 y P21. Algo análogo se observa en la Figura 43 b, con referencia al número absoluto de astrocitos.

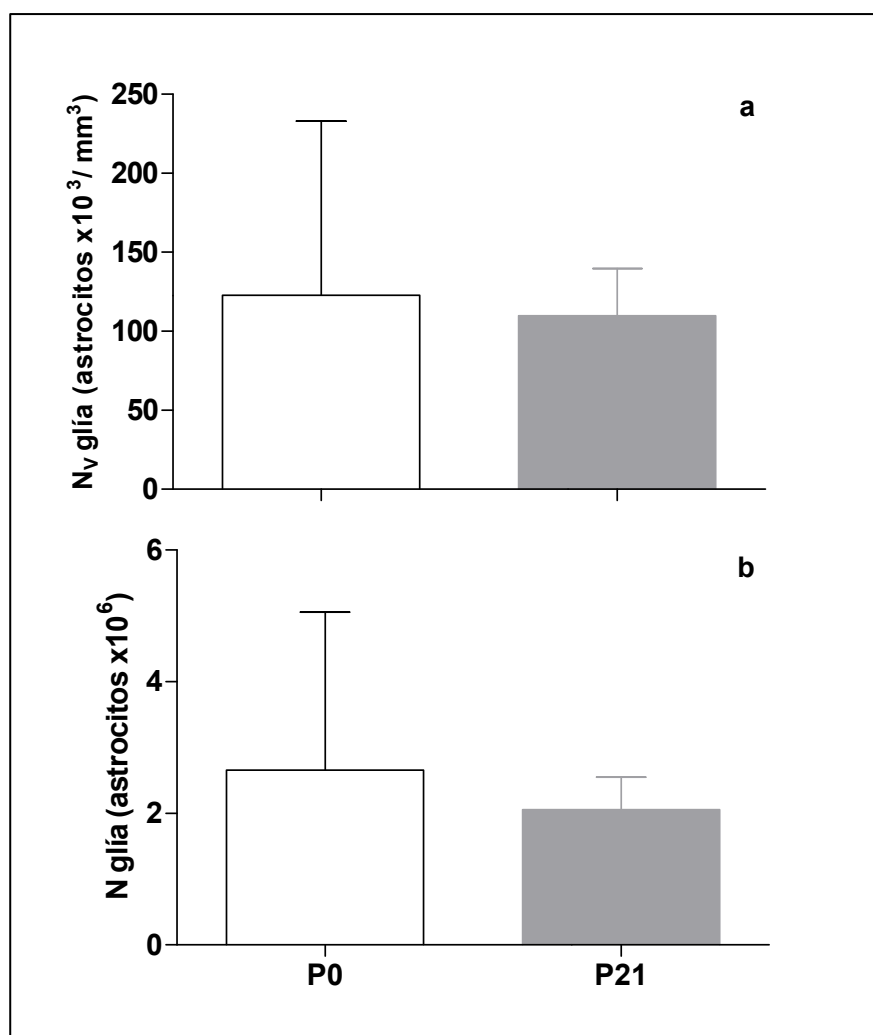


Figura 43. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones de la densidad numérica astrocitaria (N_v glía) (a) y del número absoluto de astrocitos (N glía) (b) en ratas realimentadas en P0 y en P21.

En la Figura 44, se observa que el volumen promedio neuronal no cambia en relación con el momento de comienzo de la realimentación, no detectándose diferencias significativas entre P0 y P21.

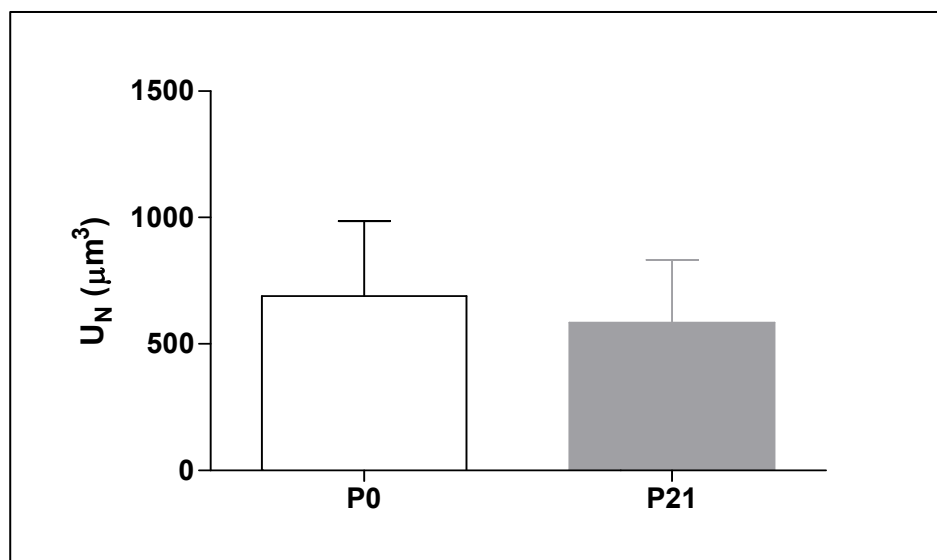


Figura 44. Diagrama de barras que expresan las medias \pm SD de las estimaciones del volumen promedio neuronal (U_N) en ratas realimentadas en P0 y en P21.

Tabla 7

VARIABLE	NUTRICION	EDAD	INTERACCION
RP	< 0.0001***	< 0.0001***	0.021*
Volumen cerebral	< 0.0001***	0.002**	0.803
Volumen V2L	0.011*	0.045*	0.025*
N _v neu	0.014*	0.330	0.043*
N neu	0.808	0.916	0.175
N _v glía	0.583	0.003**	0.257
N glía	0.296	0.001**	0.100
J _N	0.612	0.018*	0.459

Resumen de los valores de P para cada variable estudiada para los dos factores (nutrición y edad) considerados. (*) diferencias significativas; (**) diferencias muy significativas; (***) diferencias altamente significativas.

Tabla 8

VARIABLE	NUTRICION	SEXO	INTERACCION
RP	<0.0001***	0.253	0.185
Volumen cerebral	<0.0001***	0.094	0.029*
VolumenV2L	0.054	0.711	0.058
N_V neu	0.029*	0.196	0.975
N neu	0.866	0.509	0.321
N_V glía	0.059	0.182	0.239
N glía	0.468	0.818	0.909
U_N	0.438	0.074	0.980

Resumen de los valores de P para cada variable estudiada para los dos factores (nutrición y sexo) considerados. (*) diferencias significativas; (**) diferencias muy significativas; (***) diferencias altamente significativas.

7. Resultados del análisis discriminante aplicado al estudio de la clasificación de los animales en los grupos nutricionales definidos.

El análisis discriminante para las variables indicadas en la sección de Material y Métodos: Grupos de edad (≤ 30 días, > 30 días); Sexo; RP; N_V neu y N_V glía, evidenció que de todas las variables introducidas, solamente mostraron poder clasificatorio en los grupos N, DN y RA: Grupos de edad, RP y N_V neu. En la Tabla 9, se muestran dichas variables, ordenadas de mayor a menor poder clasificatorio, indicando la reducción significativa de la λ de Wilks cuando esas variables se introducen en el modelo.

Tabla 9

Variable introducida	Lambda de Wilks¹	F²	P³
RP	0.294	51.67	0.000
N _V neu	0.207	25.14	0.000
Grupos de edad	0.143	22.40	0.000

¹Esta columna muestra la λ de Wilks para cada variable introducida. ²Distribución F de Snedecor, el valor mínimo de F para introducir las variables fue 3.84. ³Nivel de significación $p < 0.05$.

Según se muestra en la Tabla 10, el porcentaje global de casos agrupados, clasificados correctamente fue del 85.7 %, un incremento, en promedio, de más del 50% sobre las probabilidades a priori de cada caso de pertenecer al grupo correcto antes de la aplicación de las funciones discriminantes.

Tabla 10

grupo real	nº de casos	grupo predicho		
		N	DN	RA
N	16	16 100%	0 0%	0 0%
DN	22	0 0%	20 91%	2 9%
RA	11	4 36%	1 9%	6 55%

En las casillas correspondientes a los grupos predichos por el análisis discriminante se indica el número de casos clasificados, junto al porcentaje sobre el total de casos estudiados en cada grupo real.

En la Figura 45, se pone en evidencia la agrupación de los casos obtenida por las funciones discriminantes elaboradas por el análisis, en torno a los centroides de cada grupo nutricional (N, DN, RA).

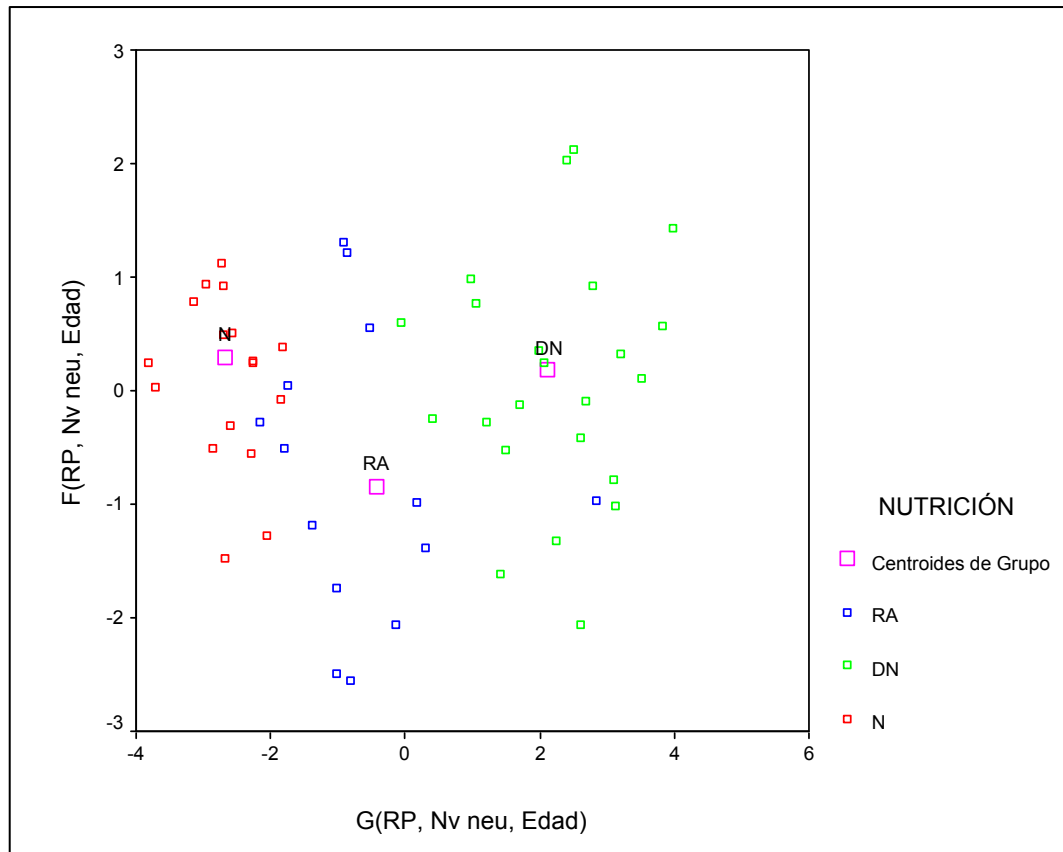


Figura 45. Gráfica donde se observa como las funciones $G(RP, N_v \text{ neu}, \text{Edad})$ y $F(RP, N_v \text{ neu}, \text{Edad})$ son capaces de clasificar en torno a los centroides de los grupos nutricionales (N, DN y RA) a la mayoría de los casos que pertenecen a dichos grupos.

VII. DISCUSIÓN.

A la luz de nuestros resultados, consideramos pertinente destacar algunos aspectos que orienten la discusión hacia unas conclusiones que nos permitan expresar nuestro aporte a este difícil y complejo campo del desarrollo neuronal, al cual hemos intentado aproximarnos desde la óptica del campo de la nutrición.

A. IMPORTANCIA DE LA FORMULACIÓN DIETÉTICA.

En este sentido, el efecto de la dieta aportada fue eficaz en la inducción de los cambios esperados, al evidenciar las diferencias tanto en peso corporal como cerebral, que exhibió el grupo de desnutridas (Kanarek y cols., 1986); así como el efecto que la realimentación tuvo en estos mismos parámetros, tal y como lo señalan otros autores en modelos experimentales semejantes (West y Kemper, 1976; Morgane y cols., 1978; Cordero y cols., 1989).

El modelo aplicado en nuestro estudio fue de desnutrición proteínica severa selectiva, respetando el aporte de los demás constituyentes esenciales de la nutrición equilibrada cuando se comenzó a aplicar la dieta al 6%, tomando en cuenta los resultados obtenidos en cuanto a respuestas fisiológicas y de conducta en los grupos de investigación mencionados. Hemos de destacar la importancia de la cuidadosa elaboración y composición de la dieta, la cual permite evitar efectos producto de condiciones extremas o aberrantes que puedan inducir cambios de más difícil predicción en los animales estudiados. En nuestra experiencia durante los pasos preliminares dados para la realización de este trabajo, vimos cómo muchas de las camadas de crías logradas bajo régimen de dietas con fórmulas no estandarizadas que usamos inicialmente, nos conducían a obtener animales con trastornos no bien diferenciados en las desnutridas con respecto a las realimentadas, llegando incluso a situaciones en las cuales las madres se comían a las crías en ambos grupos.

B. HALLAZGOS CUALITATIVOS Y MORFOLÓGICOS.

Se observa un discreto aumento de la celularidad glial apreciada tanto en la tinción con Hematoxilina y Eosina como en la inmunotinción para GFAP. Tal hallazgo impresiona como más notable en el grupo de animales Desnutridos (DN) que en el de los Nutridos (N). Este aumento se observa tanto en la corteza cerebral en general, como en el área de la corteza visual asociativa analizada específicamente en nuestro estudio (área V2L) en particular. Esto podría interpretarse como debido a la disminución del volumen de la corteza, tal y como señalaron Cragg (1972), West (1976), Angulo-Colmenares (1979), Warren y Bedi (1982), Cordero (1986, 2003) y Bedi (2003). Hay autores que no observan cambios en dicha celularidad, lo cual puede ser debido a que aplican modelos de desnutrición distintos al empleado en el presente trabajo, que no conducen a un estado de desnutrición severa o mantenida a lo largo del tiempo necesario, o bien al modo de evaluación de los cambios específicos en el transcurso de las etapas de desarrollo estudiadas (Myrtle y Guthrie, 1968; Angulo-Colmenares y cols., 1979, 1986; Davies y Katz, 1983; Bhide y Bedi, 1984, 1985; Bedi y cols., 1980, 1994, 2003; Gressens y cols., 1997). Tal aumento en la celularidad fue más pronunciado en el grupo \leq P30 y ello quizás se explique porque el área cortical estudiada por los autores antes señalados es distinta de la analizada en el presente estudio ya que, en el caso de algunos de los trabajos mencionados se empleó la corteza visual primaria (V1), y no la corteza asociativa visual V2L, las cuales tienen diferentes edades desde el punto de vista filogenético (Kaas, 1995; Ragsdale y Grove, 2001), además de que también ha sido señalada la diferencia en cuanto a las variaciones regionales de la composición celular, en las diferentes áreas cerebrales en las distintas edades de desarrollo (Dyson y Jones, 1976).

En relación con la inmunotinción para NeuN que nos permite visualizar y cuantificar las neuronas de entre todas las células presentes en el tejido cortical, no se aprecian diferencias relevantes entre los casos de ratas del grupo N y los del grupo DN salvo un

discreto pero consistente desplazamiento de la inmunorreactividad del núcleo al citoplasma en el grupo de animales desnutridos. A este respecto, también se ha observado marcaje citoplásmico para NeuN en las células de Leydig del testículo humano (Davidoff y cols.,2009)

C. HALLAZGOS CUANTITATIVOS.

En principio, hemos de destacar el hecho de que los cambios apreciados desde el punto de vista del análisis estadístico, fueron mucho más significativos en relación a los parámetros ponderales y volumétricos que en lo concerniente a los parámetros de densidad y número de la celularidad neuronal y astrocitaria estudiados con nuestra metodología. Ello contrasta con la expectativa expresada en nuestra hipótesis inicial. Sin embargo, es en la interpretación combinada de dichos hallazgos que notaremos la importancia de esa aparente invariabilidad de tales parámetros.

1. Relación peso cerebral / peso corporal (RP) y volumen cerebral.

Llama la atención la obtención de una menor ratio (RP) y un mayor volumen cerebral en el grupo de las N con respecto a las DN, en franca relación significativa con respecto a la condición alimentaria. Ambos parámetros muestran a su vez una tendencia de afectación inversa con la edad, es decir, en el grupo >P30 tanto la RP tiende a ser menor como el volumen cerebral tiende a ser mayor, con respecto a los del grupo ≤P30, lo cual podría sugerir que tal efecto del factor nutricional en edad temprana afecta más el desarrollo de las estructuras cerebrales tal y como lo señalan Cragg (1972), Smart y cols.(1973), Noback y Kisenman (1981), Bhide y Bedi (1982), Davies y Katz (1983), Valadares(2010).

En cuanto al volumen de la corteza V2L exhibió igual comportamiento que el volumen cerebral en general, es decir, disminuyó en las DN mostrando, sin embargo, mayor densidad neuronal en las DN respecto a las N que no fue seguida por un incremento del número absoluto de neuronas en esta área. La densidad neuronal aumenta en la condición de DN, probablemente debido a la disminución del volumen de la corteza V2L. No influyó ni la edad ni el sexo. Morgane y cols.(1978), West y Kemper(1976), Bedi y Bhide (1988), determinaron que la corteza cerebral exhibe una reducción en volumen después de la desnutrición neonatal y también que la corteza cerebral muestra una reducción de su amplitud con la desnutrición (Cragg, 1972; Dobbing y cols.,1971; West y Kemper, 1976).

Por otra parte, tales hallazgos coinciden con lo indicado por Dyson (1976), Morgane(1978) y Peeling (1994) en cuanto a que el crecimiento del cerebro es ciertamente menos afectado por la desnutrición que el crecimiento del resto del cuerpo, aunque de ser así, ambos factores han debido ser afectados en el mismo sentido, por lo que hemos de destacar las diferencias en cuanto a componentes estructurales que el cerebro va teniendo a esas distintas etapas de desarrollo. En este sentido, Sugita (1918) ya había señalado que tanto el peso cerebral como el volumen se continúan incrementando incluso a través de la vida post natal, aunque no tan rápidamente como en las etapas mas tempranas, y que este crecimiento tardío es debido principalmente al desarrollo de las células de sostén, de los vasos sanguíneos y a la invasión y a la arborización axonal dentro de la corteza y a su mielinización, todo lo cual va generando una separación mayor entre los cuerpos neuronales, incremento del neuropilo y el consecuente aumento del volumen cortical.

De hecho, llama la atención en nuestros resultados cualitativos, la abundante glía con evidentes prolongaciones astrocitarias perivasculares que hemos señalado. y que concuerdan con las observaciones Caley y Maxwell (1970), en cuanto a que el patrón vascular adulto en la corteza cerebral de rata se desarrolla rápidamente durante los segundos diez días post natales, coincidiendo con Sugita

(1918) al ajustar sus hallazgos mediante técnicas de “encogimiento” en sus preparaciones, aunque ha de destacarse que hasta entonces dichos autores no tuvieron acceso a las actuales técnicas estereológicas, con las cuales quizás tales hallazgos podrían reafirmarse. Por tanto, en nuestros resultados resalta la vigencia de estas observaciones, así como los aspectos señalados por Bass (1970), en cuanto al efecto que sobre estos parámetros tiene la composición acuosa y de sólidos en la dieta en estos tejidos, así como la diferente incorporación de tales sustancias en el desnutrido, siendo que la incorporación de sólidos aumenta de un 30 a un 53% en ratas entre P10 y P30. Ello concuerda con lo expresado por Dalmau (2003) en cuanto a que el período en el cual el cerebro obtiene su máxima expansión de volumen va desde el período prenatal tardío hasta la segunda semana post natal.

En N_v neu no influye la edad ni el sexo. El Volumen Neuronal Promedio (Un) es menor en el grupo de más edad ($P>30$), lo cual podría sugerir que disminuye el tamaño de las neuronas con el desarrollo, en concordancia con el hecho señalado por Shankle y cols. (1999). Al respecto, Lister y cols. (2005) señalan que, a pesar del paradigma de la pérdida de neuronas que ha de producir la desnutrición proteínica prenatal, ellos no la observaron, y no obstante si apreciaron cambios de disminución en el tamaño del soma de las células granulares del gyrus dentado.

Las cantidades absolutas y relativas de astrocitos no se ven influidas por el estado nutricional, sin embargo, ambos parámetros, singularmente en el grupo de nutridas (N) presentan una disminución en los animales por debajo de P30 cuando se compara con los animales del grupo $P>30$, hallazgo que coincide con lo descrito en edades de desarrollo astrocitario en condiciones nutricionales adecuadas (Parnavelas, 1983). Autores como Bedi (1994), Frota-Mendonça y cols.(2004), Feoli y cols. (2008), muestran resultados contrarios, y nos alertan a uniformar tanto las metodologías de modelos nutricionales como distintas regiones cerebrales exploradas antes de

poder establecer conclusiones definitivas en este sentido. El sexo de los animales tampoco parece influir a este respecto.

En la disminución del volumen de V2L detectada en el presente estudio, no influye ni la densidad ni el volumen de los astrocitos (que por lo general es muy pequeño). Por tanto, en la atrofia de V2L debería de influir el hipodesarrollo mediado por la desnutrición de otra de las estructuras del espacio interneuronal, como lo son los microcapilares sanguíneos, tal y como señalamos en nuestros resultados cualitativos. Argandoña (2003) señala el importante papel que juegan los astrocitos no solo en el mantenimiento de la plasticidad de la corteza cerebral visual de la rata, sino que también en el desarrollo de esta red microvascular, y por ende cumplen una función crucial en el acoplamiento de la actividad neuronal con el metabolismo energético. De hecho, ya en nuestras bases teóricas señalamos que la astrogliá es el principal sitio de almacenaje de glicógeno cerebral (Stichel y cols., 1991; Magistretti y Pellerin, 1996).

Otro aspecto a considerar en esta disminución del volumen de la V2L explicada por la contracción del espacio interneuronal por influencia del efecto que tuvo la desnutrición sobre los astrocitos, es el concerniente a la influencia que también tienen éstos sobre el proceso sináptico y de mielinización, dentro de una modulación recíproca de su desarrollo (Argandoña y cols., 2003).

2. Efecto del momento de inicio de la realimentación

Se pudo apreciar que el efecto de la realimentación tuvo una clara tendencia hacia la normalización tanto de la ratio como del volumen cerebral.

El volumen cerebral se recupera en RA. V2L se recupera menos que el volumen en general con respecto a RA, pero con respecto al grupo N y al grupo de DN, se mantienen las RA en una posición intermedia, tal y como lo demuestra el análisis discriminante en el cual, los grupos N y RA muestran un cierto solapamiento cuando se

clasifican con las variables de Sexo, Edad, Ratio Peso cerebral/peso corporal y Densidad neuronal y astrocitaria.

Parece que el momento del comienzo de la realimentación no influye en el cambio de algunos parámetros como el volumen de la V2L y el número absoluto de neuronas. Por ejemplo, no se obtuvo una diferencia significativa en cuanto a la tendencia hacia la normalización de estos parámetros entre las realimentadas desde P0 con respecto a las realimentadas desde P21, como lo señalan las diferencias promediales absolutas entre estos dos grupos que sugieren tal tendencia, pero con una gran dispersión. Quizás se explique por el hecho de que en el grupo P21 fue más difícil obtener un número mayor de muestras a estas edades, ya que las ratas previamente desnutridas mostraban una mayor mortalidad, así como trastornos en el tejido como para permitir una óptima manipulación para el logro de las preparaciones y tinciones.

La (N_V neu) se mantiene mayor en las ratas realimentadas a P21, la atrofia de la corteza V2L no se mejora cuando el comienzo de la realimentación es más tardío. Con respecto a la realimentación, diversos autores como Angulo-Colmenares (1979), Bass (1970), Bedi y col. (1980), Warren y Bedi (1982, 1988, 1989), Gundappa y Desiraju (1988), Díaz-Cintra y cols. (1990); observan recuperación de la anchura cortical y otros parámetros alterados por la desnutrición temprana, mediante subsecuente rehabilitación nutricional. Los otros parámetros que parecen recuperarse de desnutrición temprana son los cambios en la densidad celular glial cortical y sinapsis/neurona cortical.

Myrtle (1968), Warren y cols., (1985), Desai (1996), y Soto-Moyano, (1999) también señalan que el retorno a la dieta óptima luego de P21 (destete) no corrigió el déficit corporal, en cambio sí se corrige sí se comienza en P0, a pesar de haberse inducido una dieta hipo proteínica durante la etapa prenatal. El peso cerebral fue el menos afectado. Estos resultados coinciden con los del presente estudio.

Warren y Bedi (1982, 1983, 1984 1989), Gundappa y Desiraju (1988), y Díaz –Cintra y cols. (1990) señalan que en el sistema visual la desnutrición produce inicialmente una reducción en el número y

tamaño de las fibras ópticas que emanan desde el ojo y terminan en las estructuras de la corteza visual, así como una disminución del número de sinapsis y su relación sinapsis /neurona además de cambios en las células piramidales que la enervan. Estos cambios pueden revertirse si se mantiene el período de rehabilitación por un tiempo prolongado.

En nuestros resultados, N_V glía, N glía y U_N no varían con el comienzo de la realimentación. El resto de los parámetros estudiados no mostraron diferencias significativas entre realimentadas y desnutridas, aunque si pudo apreciarse una diferencia significativa en cuanto a la densidad neuronal entre las realimentadas desde P0 y P21, lo cual sugiere que el efecto de la realimentación es mas efectivo mientras se comience mas temprano, como ya comentamos tomando en cuenta lo mencionado por Desai (1996).

Finalmente, hemos de destacar que a nivel de los parámetros estudiados no detectamos diferencias ni interacción con respecto al sexo salvo en el volumen cerebral significativamente menor que mostraron las hembras RA con respecto a los machos de ese grupo, lo cual también consideramos atribuible a la mayor dispersión que ofreció el valor promedial obtenido en este grupo de difícil muestreo.

3. Consideraciones Funcionales.

Consideramos que en el presente trabajo hay aspectos funcionales que están muy relacionados, los cuales queremos destacar:

a) Con respecto a la disminución del volumen cerebral y el del área V2L, tanto en el grupo DN, como en el grupo RA, (aunque menos en este último) podría interpretarse como debida a la disminución del neuropilo, ocasionado a su vez por la disminución de la arborización axónica y /o de dendritas y espinas en las edades estudiadas, pudiéndose llegar a comprometer las conexiones de la corteza V2L.

b) N_V glía y N glía significativamente menores, y U_N significativamente mayor en el grupo $\leq P30$, con respecto a las $>P30$, nos hace pensar que la desnutrición podría afectar a los astrocitos y su desarrollo, y las funciones de percepción sensorial y de memoria, que se encuentran

involucradas en la corteza V2L, y que se desarrollan en edades más tardías, tal y como ha sido por diversos autores (Bedi y Bhide, 1988; Stichel y cols, 1991).

La importante disminución del neuropilo observada sugiere la posibilidad de alteraciones de la función cortical. Si está afectado el grosor de la corteza, es probable que por la condición de hipoproteinemia y de otras consecuencias de la desnutrición, estén también afectados los procesos de mielinización (Thomson y Bannister, 2003), con consecuencias funcionales tales como las señaladas por Salas (1974) en el sentido de que la reducida complejidad de las estructuras neocorticales podrían ser parcialmente responsables de la disminuida capacidad de aprendizaje y la reducción de los patrones de comportamiento adaptativo, generalmente vistos en los mamíferos adultos privados de comida durante la vida temprana; y mas recientemente por Stepanyants (2002) en lo referente con los cambios en los circuitos neuronales o plasticidad.

Tal concepto cobra para nosotros mayor relevancia sí tomamos en cuenta que también hay evidencias de plasticidad en las células gliales, establecidas a través del estudio de los cambios que en éstas inducen las distintas situaciones experimentales de crianza y adaptación de animales sometidos a distintas condiciones medioambientales, aunque con diferencias dadas para cada tipo de estructura nerviosa de acuerdo con la edad del animal en la cual se apliquen tales condiciones (Jones y cols.,1996) y , en coincidencia con lo que antes habíamos expuesto, estos cambios que muestran los astrocitos como respuesta a dichos estímulos, pueden estar relacionados con el procesamiento de información por el cerebro, ya que estas células son moduladores conocidos de actividad sináptica y, muy posiblemente, sirven como reguladores de densidad sináptica (Sirevaag y Greenough, 1991). Dichos conceptos emanados de experiencias diversas, que han incluido técnicas de expresión genética en la activación neuronal, tomados en su conjunto, sugieren que los astrocitos son importantes contribuyentes en la función cerebral normal y aluden a que la plasticidad de estas células puede ser uno de los

cambios estructurales que subyacen en el aprendizaje y la memoria (Featherstone y Fleming, 2000).

4. Consideraciones metodológicas.

Como aspecto final de esta discusión, algunas consideraciones que, desde el punto de vista metodológico, deberían tenerse en cuenta:

Para el estudio de la población astrocitaria utilizamos la técnica del cálculo de la cantidad de células gliales de V2L, inmunorreactivas para GFAP, considerada como una técnica inmunohistoquímica no específica para el estudio de la población astrogial, y su expresión se correlaciona mas con el estado funcional que con la detección de la población celular, considerándose para estos fines mas apropiada la técnica de inmunorreactividad de la proteína S-100^β, la cual se encuentra principalmente localizada en los cuerpos celulares, mientras que la positividad para GFAP se asienta en los procesos celulares, y ésta es adicionalmente mas pobre hacia las capas medias como la corteza visual (Argandoña, 2003). Sin embargo, se consideró usar GFAP en virtud de su significado funcional precisamente, ya que de esta manera podríamos seguir más correlacionadamente los aspectos de interacción neurona – glía que nos proponíamos estudiar. Obviamente, agregar el uso de S-100^β para corroborar el inferido número y tamaño de estas células, constituiría un valioso aporte en una investigación adicional.

Por otra parte, no se puede dejar de comentar que hubiese sido satisfactorio el poder haber obtenido muestras igualitarias para cada edad y condición alimentaria, y quizás hasta haber conseguido establecer tales muestreos en distintas áreas cerebrales y extracerebrales de manera simultánea, como para poder haber obtenido valores menos dispersos y mas descriptivos de las consecuencias de la desnutrición en el sistema nervioso. Las dificultades fueron muchas, y la complejidad para la obtención de resultados confiables no lo fue menos, pero se espera que este modesto aporte haya contribuido a esclarecer una pequeña parte de

tan compleja problemática, sobre todo en el sentido de haber logrado al menos señalar la afectación que a nivel de la estructura glial muy probablemente ocurrió, con el posible efecto que pueda tener en la plasticidad cerebral y su importante implicación funcional. Ello al menos, ha de estimular tanto a los autores del presente trabajo como a otros investigadores, a ahondar en esta línea investigativa.

VIII. CONCLUSIONES.

El modelo de desnutrición proteínica aplicado:

- 1) Indujo un aumento significativo a nivel de la ratio entre peso cerebral y peso corporal con tendencia a su corrección tras la realimentación.
- 2) Disminuyó el volumen de la corteza cerebral, y de la V2L. Esto fue revertido parcialmente con la realimentación a nivel de la corteza cerebral, pero tal reversión no fue significativa en la V2L.
- 3) Aumentó la densidad neuronal en V2L. La realimentación no produjo la reversión o corrección en las edades estudiadas. Sin embargo, apreciamos un valor significativamente menor en este parámetro a nivel de las realimentadas a partir de P0, con respecto a las realimentadas a partir de P21.
- 4) No se modificó el número neuronal ni el volumen promedio neuronal en V2L, aunque pudo apreciarse un valor significativamente menor de este último parámetro en las >P30, con respecto a las \leq P30.
- 5) No ocasionó cambios en la densidad ni el número de astrocitos, lo que nos induce a pensar, tomando en cuenta los hallazgos antes mencionados, que el principal efecto de la desnutrición radica en la disminución de otras estructuras del neuropilo que puede explicar la disminución del volumen obtenido en V2L.
- 6) No se observaron diferencias ni interacción con respecto al sexo, a nivel de los parámetros estudiados.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Adlard B.P.F. and Dobbing J.(1971). **Vulnerability developing brain. III. Development of for enzymes in the brains of normal and undernourished rats.** Brain Research, 28: 97-107.
2. Aghajanian G.K. and Bloom F.E. (1967).**The formation of synaptic junctions in developing rat brain: a quantitative electron microscopic study".** Brain Research, 6: 716-727.
3. Alvarez A., Requena M., Bisiacchi B. y Herrera I. (1994). **Efectos de la desnutrición proteica sobre el Sistema Nervioso Central en desarrollo.** Acta Científica Venezolana, 45(Suppl.1): 243.
4. Angelides K.J., Smith K.E., and Takeda M. (1989). **Assembly and Exchange of Intermediate Proteins of neurons: Neurofilaments are Dynamic Structures.** J. of Cells Biology, 108: 1495-1505.
5. Antonini A., Fagiolini, M., and Stryker M.P. (1999). **Anatomical correlates of functional plasticity in mouse visual cortex.** J. Neuroscience, 19(11): 4388-4406.
6. Angulo Colmenares A. G., Vaughan D. W., Hinds J. W. (1979). **Rehabilitation following early malnutrition in the rat: body weight, brain size, and cerebral cortex development.** Brain Research, 169 (1): 121-138.
7. Araque A., Carmignoto G. and Haydon P.G.(2001). **Dynamic Signaling between Astrocytes and Neurons.** Anna. Rev. Physiol., 63: 795-813.
8. Arias M.S., Baratta J., Yu J., Robertson R.T. (2002). **Absence of selectivity in the loss of neurons from the developing cortical subplate of the rat.** Brain Research Dev. Brain Res. 15,139 (2): 331-5.
9. Argandoña E.G., Rossi M.L., Lafuente J.V. (2003). **Visual deprivation effects on the α 100 β positive astrocytic population in the developing rat visual cortex: a quantitative study.** Developmental Brain Research, 141 (1-2): 63-69.
10. Bai W.Z., Ishida M., Aritmasu Y. (2004). **Chemically defined feedback connections from infragranular layers of sensory association cortices in the rat.** Neuroscience, 123: 257-67.
11. Bass N.H., Netsky M.G., Young E.(1970). **Effects of Neonatal Malnutrition on Developing Cerebrum.** Arch. Neurol., Vol 23: 289-302.
12. Bedi K.S., Thomas Y.M., Davies C.A., Dobbing J.(1980). **Synapse to neuron-ratios of the frontal and cerebellar cortex of 30 days old and adult rats undernourished during early postnatale life.** J. Comp.Neurol., Ssep 1; 193 (1):49-56.
13. Bedi K.S. (1987). **Lasting neuroanatomical changes following undernutrition during early life.** In Early Nutrition and Later Achievement (Ed. J.Dobbing) New York: Academic Press. pp: 1-49.
14. Bedi K.S. and Bhide, P.G.(1988).**Effects of environmental diversity on brain morphology.** Early Hum.Dev.,17:107-143
15. Bedi K.S. & Warren M.A. (1988). **Effects of nutrition on cortical developmental.** In the Cerebral Cortex

- 6 (Ed. A Peters & E.Jones New York: Alan R.Liss.) pp: 441-477.
16. Bedi K.S. (1994). **Undernutrition of rats during early life does not affect the total number of cortical neurons.** J. Comp.Neurol.,342 (4) : 596-602.
17. Bedi K.S. (2003).**Nutritional effects on neuron numbers.** Nutritional Neuroscience, 6 (3) : 141-152.
18. Benedict FG. **A study of prolonged fasting.** Washington, DC, Carnegie Institute, 1915. No 203.
19. Bengoa José M. (2011) **Panorama mundial de la desnutrición en el siglo XX**” Boletín electrónico de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición. Capítulo Venezolano. <http://www.slan.org.ve>
20. Bhide P.G., Bedi K.S. (1982). **The effects of environmental diversity on well-fed and previously undernourished rats: I.Body and Brain Measurements.** J. Comp. Neurol. 207: 403—409
21. Bhide P.G., Bedi K.S. (1984). **A quantitative assessment of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats.** J. Comp. Neurol., 227 : 104-108.
22. Bhide P.G., Bedi K.S. (1984). **The effects of a lengthy period of environmental diversity on well-fed and previously undernourished rats. I. Neurons and glial cells.** J. Comp. Neurol., 227: 296-304.
23. Bhide P.G., Bedi K.S. (1984). **The effects of a lengthy period of environmental diversity on well-fed and previously undernourished rats. II. Synapse to- neuron ratios.** J. Comp.Neurol., 227 : 305-310.
24. Bhide P.G., Bedi K.S. (1985). **The effects of a 30 day period of environmental diversity On well-fed and previously undernourished rats: Neuronal and Synaptic measures in the visual cortex (Area 17).** J. Comp. Neurol., 236: 121-126.
25. Berardi N., Cellerino A., Domenici L., Fagiolini M., Pizzorusso T., Cattaneo A. and Maffei L. (1994). **Monoclonal antibodies to nerve growth factor affect the postnatal development of the visual system.** Proc. Natl Acad. Sci. USA., 91 : 684-688.
26. Bisiacchi B., Gutierrez C., Aguayo J.M., Parra L.A., Alvarez A., Requena M. y Herrera I. (1997). **Efecto de una dieta hipoproteica sobre la actividad motora y la capacidad exploratoria de ratas.** Revista de la Facultad de Medicina, 20 (Supl.1) : 109.
27. Bisiacchi B., (2010). **Digestión y Absorción.** En Dvorkin M., Cardinali, D., Iermoli R. **Bases Fisiológicas de la Práctica Médica Best & Taylor Tomo II** Capítulo 26 Editorial Panamericana Buenos Aires, Argentina pp: 627-28.
28. Bjung J. (1993). **The use of the optical disector to estimate the number of neurons, glial and endothelial cells in the spinal cord of the mouse with comparative note on the rat spinal cord .** Brain Research, 627 : 25-33.
29. Bjung J., Gundersen H.J.G. (1993). **Estimate of the total number of neurons and glial and endothelial cells in the rat spinal cord by means of the optical disector.** J. Comp. Neurology, 328: 406-414.
30. Blue M.E. and Parnavelas J.G. (1983).**The formation and maturation of synapses in the visual cortex of the rat.II.Quantitative analysis.** Journal of Neurocytology, 12:697-712.

31. Boenisch T., Farmilo A.J., Stead R.H., Key M., Welcher R., Harvey R., Atwood K.N. (2001). **Immunochemical Staining Methods** Dako Corporation California 3a. Edition.
32. Bowman W.C., Rand M.J., (1984) **Farmacología, Bases Bioquímicas y Patológicas. Aplicaciones Clínicas.** Nueva Editorial Panamericana. México pp: 43.1-43-43.
33. Bradley D.J. (1993). **Environmental and health problems of developing countries.** Ciba Found Symp. 175 pp: 234-246.
34. Brodmann K. (1909). **Localisation in the cerebral cortex.** Edición traducida por Garey L.J. (1994). London. Smith-Gordon.
35. Cahill G.F. Jr. (1970) **Starvation in man.** NEJM. 282: 668-675.
36. Cahill G.F., Veech RL. (2003). **Ketoacids? Good medicine?** Trans Am Clin.Climatol.Assoc. 114:149-61.
37. Caley,D.W. and Maxwell,D.S.(1970). **Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat.** J.Comp.Neurol.138: 31-48
38. Cragg B.G. (1972). **The development of cortical synapses during starvation in the rat.** Brain, 95(1): 143-50.
39. Cenquizca Lee A., Larry W. Swanson (2007). **Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex.** Brain Research Reviews doi: 10. 1016/j. brain research rev. 56 2007. 05.002 in Elsevier B.V.
40. Connolly K.J. and Kvalsvig J.D.(1993). **Infection, nutrition and cognitive performance in children** Parasitology, 107(Suppl): S187-S200.
41. Collins G.R. (1990). **Syllabus for the laboratory animal technologist.** 72-2. American Association for Laboratory Animal Science.Joliet (Illinois) U.S.A.
42. Cordero M.E., Trejo M., García E., Barros T., Rojas A.M y Comlombo M.(1986)**Dendritic development in the neocortex of adult rats following a maintained prenatal and /or early postnatal life undernutrition** Early Human Development 14:245-258
43. Cordero M.E., Valenzuela C.Y., Rodríguez A., Aboitiz F. (2003).**Dendritic morphology and orientation of pyramidal cells of the neocortex in two groups of early postnatal undernourished-rehabilitated rats.** BrainRes.Dev.Brain.Res., 142 : 37-45.
44. Cowley J.J. and Griesel R.D. (1959).**Some effects of a low protein diet on a first filial generation of white rats.**The Journal of Genetic Psychology.,95 : 187-201.
45. Cowley J.J. and Griesel R.D. (1963).**The development of second-generation low-protein rats.** The Journal of Genetic Psychology.,103: 233-242.
46. Cruz-Orive L.M. (1987a). **Particle number can be estimated using a disector of unknown thickness: The selector.** J. Microsc.,145 : 121-142.
47. Cruz-Orive L.M.(1987b). **Stereology: Recent solutions to old problems and a glimpse to the future.** Acta Stereologica., 6: 3-18.
48. Davidoff MS, Middendorf R, Müller D, HolsteinAF(2009) **The Neuroendocrine Leydig Cells and their Stem Cell Progenitors, the Pericytes.** Advances

- in **Anatomy, Embryology and Cell Biology**. Springer Verlag, Heidelberg, 205: 27,
49. Dalmau I., Vela J.M., González B, Finsen B., Castellano B. (2003). **Dynamics of microglia in the developing rat brain**. J. Comp. Neurol., 458 (2): 144-57.
 50. Davies C.A., katz H.B. (1983) **The comparative effects of early- life undernutrition and subsequent differential environments on the dendritic branching of pyramidal cells in rat visual cortex**. J. Comp. Neurol., 18: 345-50.
 51. Delemarre -Van Der Waal H.A. (1993).**Environmental factors influencing growth and pubertal development**. Environ.Health Perspect.,101 (Suppl.2) : 39-44.
 52. DeOnis M., Monteiro C., Akre J. and Glugston G.(1993).**The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition:an overview from the Who Global Database on Child Growth**. Bull.World Health Organ.,71 : 703-712.
 53. Desai M., Crowther N.J., Lucas A., and Hales C.N. (1996). **Organ –selective growth in the offspring of protein-restricted mothers**. British Journal of Nutrition, 76: 591-603.
 54. Díaz Cintra,S.,Cintra L., Ortega A., Kemper,T. & Morgane,P.J.(1990). **Effects of protein deprivation on pyramidal cells of the visual cortex in rats of three age groups**. J. Comp. Neurol.292:117-126.
 55. Di Biasi A., Salvati S. (1997). **Exogenous lipids in myelination and emyelination**. Kaohsiung J. Med Sci., 13: 19-29.
 56. Dobbing J., Hopewell,J.W & Lynch A.(1971). **Vulnerability of developing brain .VII. Permanent déficit of neurons in cerebral and cerebellar cortex following early mild undernutrition**. Exp.Neurol.32:439-447.
 57. Dobbing J. (1974). **Prenatal nutriton and neurological development**. XII : 96-110.
 58. Dobbing J. and Smart J. (1974). **Vulnerability of developing brain and behaviour**.British Medical Bulletin, 30: 164-168.
 59. Dobbing J. (1981). **The later development of the brain and its vulnerability**. I Scientific Foundations of Paediatrics (Ed. J.A. Davies & J. Dobbing) 2nd Ed London: Heinemann.
 60. Dobbing J. (1987). **Early nutrition and later achievement**. (AcademicPress London).
 61. Durham H.D., Salera I. and Dahrouge S. (1989). **Evidence that formation of an Intermediate Filament-Protein Complex Plays a Primary Role in Aggregation of Neurofilaments, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)-Filaments and Vimentin- Filaments by 2,5- Hexanedione**. J. of Neuropathology and Experimental Neurology, 48:197-211.
 62. Dyson S.E. and Jones D.G. (1976). **Undernutrition and the developing Nervous System**. Progress in Neurobiology, 7: 171-196.
 63. Fame R.M., Mac Donald J.L., Macklis J.D. (2010).**Development, Specification, and Diversity of callosal projection neurons(CPN)**Tins 797:1-10.
 64. FAO (1970). **Aminoaci content of food and Biological data on Proteins**. FAO Nutritional Studies No.24. Food and Agr. Organization.Rome.<http://faostat.fao.org/site/562/default.aspx>

65. <http://faostat.fao.org/site/562/default.aspx> (2009)
66. Feoli A.M., Leiti M.C., Tramontina A.C., Tramontina F., Posser T.,Rodrigues L.,Swarowsky A.,Quincozes-Santos A., Leal R.B., Gotfried C., Perry M.L., Goncalves C.A.(2008). **Developmental changes in content of glial marker proteins in rats exposed to protein malnutrition.** Brain Research 1187 :33-41
67. Featherstone R.E., Fleming A.S.(2000) **Plasticity in the maternal circuit: effects of experience and partum condition on brain astrocyte number in female rats.** Behavioral Neuroscience., 114: 158-172.
68. Ferrán Aranaz M. (1997). **SPSS para Windows Programación y Analisis Estadístico (Análisis Discriminante)** Mc. Graw Hill, pp: 287-308.
69. Fukuda Y. (1977). **Three group classification of rat retinal ganglion cells: histological and physiological studies.** Brain Research, 119 : 327-344.
70. Gaillard F. and Sauv Y. (2006).**Fetal tissue allografts in the central visual system of rodents.** Webvision.med.utah.edu.
71. Gambetti P., Autilio Gambetti L., Gonatas N.K., Shafer B.,and Stieber A. (1972). **Synapses and Malnutrition. Morphological and Biochemical study of synaptosomal fractions from rat cerebral cortex.** Brain Research, 47 : 477-484.
72. Gilbert M.E.,Mac Phail R.,Baldwin J., Moser V.C., Chernoff N.(2010).**Moderate developmental undernutrition: Impact on growth and cognitive function in youth and old age.** Neurotoxicology and Teratology 32 :362-72
73. Giuffrida A.M., Hamberger A., Serra I. and Geremía E. (1980). **Effects of Undernutrition on Nucleic Acid Synthesis in Neuronal and Glial from Different Regions of developing Rat Brain.** Nutr. Metab. 24: 189-198
74. Gomes F.C.A., Paulin D. and Moura Neto V. (1999). **Glial Fibillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte defferentiation.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 32:619-631
75. Gómez-Jarabo G., Gines Llorca R. (2009): <http://www.biopsicologia.net/nivel-3-participacion-plastica-y-funcional>
76. Gorman K.S. (1995). **Malnutrition and cognitive development: evidence from experimental studies among the mild-to-moderate malnourished.** J.Nutr.,125: 2255S-2262S.
77. Grantham-McGregor, S.(1995). **A review of studies of the effect of severe malnutrition on mental development.** J. Nutr.,125: 2233S-2238S.
78. Gredell J.A.,Turnquist P.A., Maelver M.B. and Pearce R.A. (2004). **Determination of diffusion and partition coefficients of propofol in rat brain tissue: implications for studies of drug action in vitro. Laboratory Investigations. British Journal of Anaesthesia,** 93(6): 810-17.
79. Greenough W.T. and Chang E.F. (1988).**Plasticity of synapse structure and pattern in the cerebral cortex.I.In:** Peters and Jones E., Eds. Cerebral Cortex: Development and Maturation of Cerebral Cortex (Plenum Press,New York) pp: 391-440.
80. Gressens P., Muaku S.M., Besse L., Nsegbe E., Gallego J., Delpeh B., Gaultier C., Evrard P., Ketyelslegers

- J.M., Maiter D. (1997). **Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny.** Brain Research, 103: 21-35.
81. Gundersen H.J. (1986). **Stereology of arbitra perticles. A review of unbiased number and size estimations and the presentation of some new ones in memory of William Thompson.** J. Microsc., 143: 3-45.
 82. Gundappa G., Desiraju T. (1988) **Deviations in brain development of F2 generation on caloric undernutrition and scope of their prevention by rehabilitation: alterations in dendritic spine production and pruning of pyramidal neurons of lower laminae of motor cortex and visual cortex.** Brain Res..26,456(2):205-23.
 83. Hatton G.I. (2002). **Glial-Neuronal interactions in the mammalian brain.** Advances in Physiology Education, 26 (4): 225-237.
 84. Hawrylak N. and Greenough W.T. (1995). **Monocular deprivation alters the morphology of glial fibrillary acidic- immunoreactive astrocytes in the rat visual cortex.** Brain Research, 683: 187-199.
 85. Howard C.V. y Reed M.G. (1998). **Unbiased Stereology. Three-dimensional measurement in microscopy.** Bios.Scientific Publ.Oxford UK.
 86. Howard C.V. y Reed M.G. (2005). **Unbiased Stereology. Three-dimensional measurement in microscopy.** Bios.Scientific Publ.Oxford UK.
 87. Jacobson M. (1991). **Histogénesis and Morphogenesis of cortical structures.** Developmental Neurobiology. Plenum Press, New York pp: 401-451.
 88. Jacobsen C.T, Miller R.H. (2003). **Control of astrocyte migration in the developing cerebral cortex.** Dev. Neurosci., 25 : 207-216.
 89. Jensen E.B., Sundberg R. (1986). **Generalized associated point methods for sampling planar objects.** J. Microscopy., 144 : 55-70.
 90. Jones T.A., Hawrylak N. and Greenough W.T. (1996). **Rapid laminar-dependent changes in GFAP immunoreactive astrocytes in the visual cortex of rats reared in a complex environment.** Psychoneuroendocrinology, 21(2):189-201
 91. Kageyama G.H., Robertson R.T. (1993). **Development of geniculocortical projections to visual cortex in rat: evidence early ingrowth and synaptogenesis.** J. Comp Neurol., 335(1): 123-148.
 92. Kanarek, R.B., Schoenfeld P.M. and Morgane P.J. (1986). **Maternal Malnutrition in the rat: Effects on food intake and body weight.** Physiology & Behavior 38 pp: 509-515. Pergamon Press Ltd, Prited in U.S.A.
 93. Kandel E.R. Schuartz J.H., Jessell T.M. (2000) **Principios de Neurociencia.** Mc. Graw- Hill. Interamericana. Cuarta Edición
 94. Kanold PO, Kara P, Reid RC, Shatz CJ (2003). **Role of subplate neurons in functional maturation of visual cortical columns.** Science 301: 321-5.
 95. Kaschube M., Schnabel M., Löwel Wolf F. (2008). **Inter-areal coordination of columnar architectures during visual cortical development.** Air Xiv:0801.4164v1.

96. Kass J.H. (1995). **The evolution of Isocortex.** Brain Behav. Evol., 46 : 187-196.
97. Katz H.B., Davies C.A. and Dobbing J. (1980). **The effect of environmental stimulation on brain weight in previously undernourished rats.** Behavioural Brain Research, 1: 445-49
98. Kirsey A., Morre D.M. and Wasynczuk A.Z. (1990). **Neuronal development in vitamin B6 deficiency.** Ann. N.Y. Acad. Sci., 585 : 202-218.
99. Kirsey A., Wasynczuk A.Z. (1993). **Morphological, biochemical and functional consequences of vitamin B6 deficits during central nervous system development.** Ann. N.Y. Acad. Sci., 678: 62-80.
100. Krettek J.E. & Price J.L. (1977). **The cortical projections of the mediodorsal nucleus and adjacent thalamic nuclei in the rat.** J. of Comparative Neurology 171: 157-192.
101. Krieg, W.J.S. (1947). **Connections of the cerebral cortex I. The albino rat. C. Extrinsic connections.** J. Comp. Neurol., 86 : 267-394.
102. Laemle L.K., Sharma S.C. (1986). **Bilateral projections of neurons in the lateral geniculate nucleus and nucleus lateralis posterior to the visual cortex in the neonatal rat.** Neurociences Letters 63 : 206-214.
103. Largo R.H. (1993). **Catch-up growth during adolescence.** Horm. Res., 39(Supl.3): 41-48.
104. Lehninger A.L. (2009). **Bioquímica Las Bases Moleculares de la Estructura y Función Celular.** Ediciones Omega, S.A. Segunda Edición. Barcelona pp: 71-103.
105. Leibnitz L., Bar B., Günther L., Ludwig R., and Hedlich A. (1982). **The glia types in the Visual System of adult rats, their shape variability, distribution patterns and their ligthoptically visible contacts to other tissue structures.** J. Hirsforsch, 28: 225- 238.
106. Levitsky D.A. and Strupp B.J. (1995) **Malnutrition and the brain: Changing concepts, Changing Concerns** J. Nutr. 125: 2212s-2220s
107. Levitt P. (2003) **Structural and Functional maturation of the developing primate brain** J Pediatric 143: 835-45
108. Lindsay H.A. (1993). **The nutrition CRSP: what is marginal malnutrition and does it affect human function ?** Nutr. Rev., 51 : 225-267.
109. Lister J.P., Blatt G.J., DeBassio W.A., Kemper T.L., Tonkiss J., Galler J.R. and Rosene D.L. (2005). **Effect of prenatal protein malnutrition on numbers of neurons in the principal cell layers of the adult rat hippocampal formation.** Hippocampus 15: 393-403.
110. López Aranda M. F., López Tellez J. F., Navarro Lobato, I., Masmundi Martín M. Gutiérrez A., Khan, Z. U. (2009). **Role of layer 6 of V2 Visual Cortex in Object-Recognition Memory.** Science, 325(87): 87-9.
111. Lorente De No (1938). **The Cerebral Cortex: Architecture Intracortical Connections and Motor Projections.** Ed. Fulton. Oxford-Press; New York pp: 291-338.
112. Madeira D.M., Pereira A., Cadete L. A. and Paula-Barbosa M.M. (1990). **Estimates of volumen and piramidal cell numbers in tHe prelimbic subarea of the pre-frontal cortex in**

- experimental hypothyroid rats.**
J.Anat.,171 : 41-56.
113. Magistretti P.J. and Pellerin L. (1996). **Cellular Bases of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging: Evidence for a prominent role of astrocytes.** Cerebral Cortex 6(1):50-61
 114. Malach R. (1989). **Patterns of connections in rat visual cortex.** Journal of Neuroscience, 9(11): 3.741-52.
 115. Malach R., Amir Y., Harel M., and Grinvald A. (1993). **Relationship between intrinsic connections and functional architecture revealed by optical imaging and in vivo targeted biocytin injections in primate striate cortex.** Proc.Natl. Acad. Sci. USA., 90 : 10469-10473.
 116. Mayhew T.M.(1991). **The new stereological methods for interpreting functional morphology from slices of cells and organs.** Experimental Physiology 76 pp: 639-665.
 117. Mayhew T.M., Gundersen H.J.G. (1996). **"If you assume, you can make an ass out of and me" a decade of the disector for stereology counting of particles in 3D space.** J. Anat. 188 pp: 1-15.
 118. Mendonca Frota J.E., Ramos Vilela M.C., Bittencourt H(2004) **GFAP Expresión in Astrocytes of Suprachiasmatic Nucleus and Medial Preoptic Area are Differentially affected by MN during Rat Brain Development.** Nutritional Neuroscience 7:223-34
 119. Miller S.A. (1969). **Protein metabolism during growth and development.** In H.NMurro (Ed.) Mammalian Protein Metablism. 3. Academic Press, New York pp: 183-233.
 120. Miller M.W. (1986). **Maturation of rat visual cortex. III. Postnatal morfogenesis and synaptogenesis of local circuit neurons.** Developmental Brain Research, 25: 271-285.
 121. Morgane P.J., Miller M., Kemper T., Stern W., Forbes W., Hall R., Bronzino J.,Kissane J., Hawryleicz E. and Resnick O. (1978). **The effects of protein malnutrition on the developing central nervoussystem in the rat.** Neurosci.Biobehav.Rev.,2 : 137-230.
 122. Mueller A.J. and Cox W.M.Jr. (1945). **The effect of changes in diet on the volume and composition of rat milk.** JN. The Journal of Nutrition : 249-259
 123. Mullen R.J., Buck C.R., and Smith A.M. (1992). **NeuN A neuronal specific nuclear protein in vertebrates.** Development, 116: 201-211.
 124. Myrtle Brown L., Guthrie H. A.(1968). **Effect of severe undernutrition in early life upon body and organ weights in adult rats.** Growth, 32: 143-150.
 125. Needham J. (1931). **Chemical Embriology.** Cambridge Univ. Press, London and New York.
 126. Noback C.R. and Kisenman (1981). **Some effects of protein—calorie undernutrition on the developing Central Nervous System of the rat.** The Anatomical Record 201:67-73.
 127. Oppenheim (1991). **The role of targets, afferents, and other influences in regulating neuronal survival.** Review Developmental Neuronal Death:461-7
 128. Osborn M., Weber K. (1986). **Intermediate filament proteins: a multigene family distinguishing major cell lineages.** Tibss, 11: 49-72.

129. Parnavelas J.G., Mounty E.J., Bradford R., Lieberman A.R. (1977). **The postnatal development of neurons in the dorsal lateral geniculate nucleus of the rat: a Golgi study.** J. Comp. Neurol., 171: 481-99.
130. Parnavelas J.G., (1983). **A qualitative and quantitative ultrastructural study of glial cells in the developing visual cortex of the rat.** Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 301 : 55-84.
131. Patiño J.F. (1981). **Metabolismo, Nutrición y Shock en el paciente quirúrgico. Lecciones de Fisiología Aplicada.** Fundación Lucía Patiño Osorio. Segunda Edición. Bogotá pp: 51-53, 8-85, 164-165.
132. Paz M. M., Valente G.B., Tasca C. I., Mattos A.G., Pessoa Pereur (1991). **Malnutrition induces and increase in intermediate filament protein content of rat cerebral cortex.** Protein and Aminoacids 0022-3166/91.
133. Paxinos J., Watson C. (1998). **The Rat Brain** In Atlas Stereotaxic Coordinates Fourth Edition Academic Press Figs: 39-49.
134. Peeling A.N. and Smart J.L.(1994). **Review of literature showing that undernutrition affects the growth rate of all processes in the brain to the same extent.** Metabolic Brain Disease, 9, (1) : 33-42.
135. Perry, V.H. (1980). **A tectocortical visual pathway in the rat.** Neuroscience, 5:915-927.
136. Pollit, E. (1995). **Functional significance of the covariance between protein energy malnutrition and iron deficiency anemia.** J.Nutr., 125 : 2272S-2277S.
137. Purves D., White L.E., Riddle D.R. (1996). **Is neural development darwinian?** Trends Neurosci.,19 : 460 – 464.
138. Ragsdale C.W. and Grove E.A. (+) (2001). **Patterng the mamalian cerebral cortex.** Neurobiology, 11 : 50-58.
139. Resnick O., Miller M., Forbes W., Hall R., Kemper T., Bronzino J. and Morgane P.J. (1979). **Developmental Protein Malnutrition: Influences on the Central Nervous System of the rat.** Neuroscience & Biobehavioral Reviews 3:233-246
140. Riley A.P. (1994). **Determinants of adolescent fertility and its consequences for maternal health, with special reference to rural Bangladesh.** Ann. N.Y. Acad Sci., 709: 86-100.
141. Robertson R.T, Tijerina A.A. and Gallivan E.(1985). **Transient Patterns of Acetylcholinesterase Activity in Visual Cortex of the rat: Normal Development and the Effects of the Neonatal Monocular Enucleation.** Developmental Brain Research, 21: 203-214.
142. Robertson R.T, Fogolin, R.P., Tijerina A.A and Yu J. (1986). **Effects of neonatal monocular and binocular enucleation on transient acetylcholinesterase activity in the developing rat visual cortex.** Developmental Brain Research, 33 : 185-197.
143. Robertson R.T, Hanes M.A. and Yu J. (1987). **Investigations of the origins of transient acetylcholinesterase activity in the developing rat visual cortex.** Developmental Brain Research, 41 (1/2) : 1-23.
144. Robertson R.T, Fehrenbach C.J.YuJ. (1990). **Neura Systems contributing to**

- acetylcholinesterase histochemical staining in primary visual cortex of the adult rat.** Brain Res., 509(2): 181-97.
145. Rocha de Melo and Guedes R.C.A. (1997) **Spreading depression is facilitated in adult rats previously submitted to short episodes of malnutrition during the lactation period.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 30: 663-669
 146. Rodriguez R., Pozuelo J.M., Sanchez Alberca A., Arriazu R., Cárdenas J.M., Ingelmo I., Martín R., Santamaría L. (2007). **Evolution of neuroendocrine cell population and peptidergic innervation, assessed by discriminant analysis, during postnatal development of the rat prostate.** Image Anal Stereol., 26 : 1-11.
 147. Rosa M.G.P., Krubitzer L.A. (1999). **The evolution of visual cortex: Where is V2?** Trends in Neurosciences, 22 (6) : 242-248.
 148. Rosa M.G.P. (2005). **Clarifying homologies in the mammalian cerebral cortex: The case of the third visual area (V3).** Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 32 : 327-39.
 149. Rubio P. (2006). **Diversidad funcional y estructural de las vías tálamo-corticales.** Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencias. Madrid- España.
 150. Rumberger A., Tyler C.J., and Lund J.S. (2001). **Intra and Interareal connections between the primary visual cortex VI and the area immediately surrounding VI in the rat.** Neuroscience, 102 (1) : 35-52.
 151. Salas M., Díaz S., Nieto A. (1974) **Effects of neonatal food deprivation on cortical spines and dendritic development of the rat.** Brain Research, 73:139-144.
 152. Schönheit B., Haensel P. (1988). **Neurohistologic studies of cortical pyramidal neurons in the rat following rehabilitation of early postnatal malnutrition.** Journal fur Hirnforschung, 29 : 599-615.
 153. Schurch B. (1995). **Malnutrition and behavioral development: the nutrition variable.** J.Nutr., 125: 2255S-2262S.
 154. Sereni F., Principi N., Perletti L., and Sereni L. (1966). **Undernutrition and the developing rat brain.** Biol. Neonat. 10:254-265
 155. Sefton A.J, Dreher B. (1995). **Visual System In the Rat Nervous System .** Paxinos J. Academic Press pp: 833-898.
 156. Shankle W.R., Rafii M.S., Landing B.H. and Falon J.H. (1999). **Approximate doubling of numbers of neurons in postnatal human cerebral cortex and in 35 specific cytoarchitectural areas from birth to 72 months.** Pediatric and Developmental Pathology 2:244-59
 157. Sikes R.W., Fuller G.N., Colbert C., Chonister R.B., De France J. and Wiggis R.C. (1981). **The relative numbers of oligodendroglia in different brain regions of normal and postnatally undernourished rats.** Brain Research Bulletin, 6 : 385-391.
 158. Sirevaag A.M. and Greenough W.T. (1991). **Plasticity of GFAP-immunoreactive astrocyte size and number in visual cortex of rats reared in complex environments.** Brain Research, 540:273-278
 159. Skoglund T.S., Pascher R., Berthold C.H. (1996). **Heterogeneity in the columnar number of neurons in different**

- neocortical areas in the rat.**
Neuroscience Letters, 208: 97-100.
160. Simeon D.T. and Grantham-McGregor S.M. (1990). **Nutritional deficiencies and children's behaviour and mental development.** Nutr.Rev., 3 :1-24.
 161. Smart J.L., Dobbing, J., Adlard, B.P.F., Lynch A. y Sands, J. (1973) **Vulnerability of developing brain relative effects of growth restriction during the fetal and suckling periods on the half of brain composition of adult rats.** Journal Nutr. 103:1327-38
 162. Smith P.H., Manning K.A. and Uhlich D.J. (2010). **Evaluation of inputs to rat primary auditory cortex from the supragenulate nucleus and extrastriate visual cortex.** J.Comp. Neurology Research in Systems Neurociense, 518: 3679-3.700.
 163. Soto Moyano R., Fernández Victor, Sabuesa M., Beldar J., Kusch C., Pérez H., Ruiz S. and Hernández A. (1999) Effects of mild protein prenatal malnutrition and subsequent postnatal nutritional rehabilitation on noradrenaline release and neuronal density in the rat occipital cortex Developmental Brain Research 116: 51-58
 164. Stanfield J.P. (1982). **The influence of malnutrition on development.** Nutrition 226: 1929
 165. Stein T.P, Buzby G.P. (1981) **Surg Clinics NA.**, 61:519-52.
 166. Stepanyants A., Hof P.R. and Chklovskii. (2002). **Geometry and Structural Plasticity of Synaptic Connectivity.** Neuron, 34 : 275-288
 167. Sterio D.C. (1984). **The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector.** Journal of Microscopy, 127: 127-136.
 168. Stichel C.C., Müller C.M. and Zilles K. (1991). **Distribution of glial fibrillary acidic protein and vimentin immunoreactivity during rat visual cortex development.** J. Neurocytology, 20 : 97-108.
 169. Strupp B. and Levitsky D.A. (1995). **Enduring cognitive effects of early malnutrition: a theoretical reappraisal.** J.Nutr., 125 : 2221S-2232S.
 170. Sugita N. (1918). **Comparative studies on the growth of the cerebral cortex.** J. Comp. Neurol., 29, (1): 1-278.
 171. Sur M. and Cowey A. (1995). **Cerebral cortex: function and development.** Neuron, 15: 497-505.
 172. Sur M. and Rubenstein J.L.R. (2005) **Patterning and Plasticity of the Cerebral Cortex** Science 310 805-810
 173. Sutor B., Hagerty T. (2005). **Involvement of gap junctions in the development of the neocortex.** Biochimica et Biophysica Acta, 1719: 59-68.
 174. Thomson A.M. and Bannister P. (2003) **Interlaminar connections in the Neocortex.** Cerebral Cortex ,13: 5 -14.
 175. United Nations Food and Agriculture Organisation UNFAO (2004). **The state of food insecurity in the world: Undernourishment around the world.** [Http://64.233.179.104/translate_c?hl=es&sl=en&u=http://www.worldhungercampaign.org](http://64.233.179.104/translate_c?hl=es&sl=en&u=http://www.worldhungercampaign.org).
 176. Uauy R. and De Andrade J. (1995). **Human milk and breast feeding for optimal mental development.** J.Nutr., 125 : 2278S-2280S.
 177. Valadares, C.T., Fukuda M.T.H., Françolin-Silva A.L., Hernandez A.S., Almeida S.S. (2010) **Effects of postnatal protein**

- malnutrition on learning and memory procedures.** *Nutritional Neuroscience* 2010 Vol 13 No 6
178. Van Eden C.G. & Ulyngs H.B.M. (1985^a). **Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat.** *J. of Comparative Neurology*, 241 : 253-267.
 179. Van Eden GC.G. & Ulyngs H.B.M. (1985b). **Post-natal volumetric developmental of the prefrontal cortex in the rat.** *Journal of Comparative Neurology*, 241: 268-274.
 180. Van Gelden N.M. (1994). **The environment and intellectual development.** *J. Neurochem*, 62 : S11
 181. Vannucci S.J. (2003) **Simpson I.A. Developmental switch in brain nutrient transporter expression I the rat.** *Am J Physiol. Endocrinol Metab.*, 285: E1127-E1134.
 182. Villescas R., Zamenhof S., and Guthrie D. (1979). **The effects of early stress and undernutrition on the behavior of young adult rats and the correlations between behavioral and brain parameters.** *Physiology & Behavior*, 23 : 945-954.
 183. Wachs T.D. (1995). **Relation of mild-to-moderate malnutrition to human development: correlational studies.** *J. Nutr.*, 125 : 2245S-2254S.
 184. Warren M.A. and Bedi, K.S. (1984). **A quantitative assement of the development of synapses and neurons in the visual cortex of control and undernourished rats.** *J. of Comparative Neurology*, 227: 104-108.
 185. Warren M.A. and Bedi, K.S. (1985). **The effects of a lengthy period of undernutrition on food intake and on body and organ growth during rehabilitation.** *J. Anat.*, 141: 65-75.
 186. Warren M.A., Bedi K.S. (1990) **Synapse to neuron ratios in rat cerebellar cortex following lengthy periods of undernutrition.** *J. Anat.*, 170 : 173-82.
 187. Weindruch R.H. (1996). **Caloric restriction and ageing.** *Scientific American* : 32-38.
 188. West C.D, Kemper T.L. (1976). **The effect of a low protein diet on the anatomical development of the rat brain.** *Brain Res.*, 107: 221-37.
 189. Widdowson E.M., (1972) **Nutrition and the Nervous System** *Bibl. "Nutr. Diet"* 17: 5-15
 190. Winick, (1983) **Nutrition and early development.** *Institute of Human Nutrition Columbia University New York, New York 10032*
 191. Wolfe B.M. (1981) **Shock E. Energy sources, stores and hormonal control.** *Surg. Clin. N.A.*, 61: 509-518.
 192. Yoshida H., Yun Kong Y. (1998). **Apaf 1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development.** *Cell*, 94: 739-750.
 193. Young V.R., Scrimshaw N.S. (1971) **The Physiology of Starvation.** *Scient Am.*, 225: 14-22.
 194. Zamenhof, S. and Van Marthens, E. (1978). **The effects of agude malnutrition on the development of brain and body.** *J. Nutr.*, 108: 1719-23.
 195. Zamenhof, S (1981) **Maternal Nutrient Storage and Efficiency in Production**

offetal Brain Tissue in Rats. Biol.
Neonate39:45-51

196. Zilles K., Wree A. (1995). **Cortex: Areal and Laminar Structure** en Paxinos G. 2da. Ed. **The Rat Nervous System** Ed. Academia Press. 1995 pp: 649-685.

X. INDICE DE ABREVIATURAS.

(ACHE)	Acetilcolinaesterasa
(A1)	Corteza Auditiva Primaria
(A2B5)	Acido Antigangliósido
(AL)	Area Anterolateral
(Allv)	Area Somatosensitiva Ventral
(Alld)	Area Somatosensitiva Dorsal
(BSA)	Albúmina Sérica Bovina
(CA1)	Campo CA1 del Hipocampo
(CNP)	2'3' Cyclonucleótido-3` Fosforilasa
(DAB)	3-3` Diaminobenzidina-Tetrahydrochloride
(DN)	Desnutridas
(DQ)	Cociente de Desarrollo
(EGF)	Factor de Crecimiento Epitelial
(F1)	Primera Generación
(F2)	Segunda Generación
(F6)	Sexta Generación
(GABA)	Acido Gamma-aminobutírico
(GFAP)	Proteína Acida Gliofibrilar
(GLUTs)	Enzima Transportadora de Glucosa Facilitativa
(GND)	Núcleo Geniculado Dorsal
(GNL)	Núcleo Geniculado Lateral
(GNM)	Núcleo Geniculado Medial
(HE)	Hematoxilina –Eosina
(IA)	Interaural
(IF)	Filamentos Intermedios
(IgA)	Inmunoglobulina A
(IgG)	Inmunoglobulina G
(IGF)	Factor de Crecimiento Tipo Insulina
(IQ)	Cociente de Inteligencia
(KD)	Kilo Dalton
(LLA)	Area Láterolateral Anterior
(LI)	Area Látero-Intermedia
(LL)	Area Láterolateral

(LM)	Area Lateromedial
(MAG)	Glicoproteína Asociada a la Mielina
(MCTs)	Proteínas Transportadoras del Acido Monocarboxílico Protón acopladas
(MN)	Malnutridas
(MOG)	Proteína Mielínica de los Oligodendrocitos
(MPB)	Proteína Básica de Mielina
(N)	Nutridas
(NGF)	Factor de Crecimiento Endógeno
(P)	Dias de Postnacimiento
(PA)	Area Parietal Insular
(PBS)	Buffer Fosfato Salino
(PCM)	Desnutrición Proteínico-Calórica
(PEM)	Carencia de Energía Proteínica
(PLP)	Proteína Proteolítica
(PO)	Núcleo Posterior del Tálamo
(PRh)	Corteza Perhirinal
(RA)	Realimentadas
(S1)	Corteza Somatosensitiva Primaria
(SII)	Corteza Somatosensitiva Secundaria
(SNC)	Sistema Nervioso Central
(TeA)	Corteza Temporal Asociativa
(Te2D)	Corteza Temporal Asociativa Secundaria
(Te3R)	Corteza Temporal Asociativa Rostral
(UI)	Unidades Internacionales
(V1/OC1)	Corteza Visual Primaria
(V1M/OC1M)	Corteza Visual Primaria --Area Monocular
(V1B/OC1B)	Corteza Visual Primaria --Area Binocular
(V2/OC2)	Corteza Visual Secundaria
(V2L)	Corteza Visual Secundaria --Area Lateral
(V2M)	Corteza Visual Secundaria --Area Medial
(VF)	Volumen en Fresco